

INDIVIDUALISIERTE MOLEKULARE MARKER ZUR
DETEKTION VON REZIDIVEN BEI
TONSILLENKARZINOMEN

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Nicole Bernstein

geboren am 06.09.1988 in Jena

Gutachter

- 1.** Univ. Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst, Universitätsklinikum Jena, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Abt. Frauenheilkunde, FB Gynäkologische Molekularbiologie
- 2.** Univ. Prof. Dr. med. Orlando Guntinas-Lichius, Universitätsklinikum Jena, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
- 3.** Prof. Dr. med. Markus Hoffmann, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.11.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	8
1. Einleitung	10
1.1. Humanes Papillomavirus	10
1.1.1 Genom und Proteine	11
1.1.2 Klassifizierung.....	12
1.1.3 Infektionsverlauf.....	12
1.1.4 HPV-assoziierte Krankheiten	15
1.2 Tonsillenkarzinom	16
1.2.1 Anatomie und Funktion der Tonsilla palatina	16
1.2.2 Epidemiologie und Klassifikation	18
1.2.3 Ätiologie	18
1.2.4 Diagnose und Krankheitsverlauf	20
1.2.5 Therapie	21
1.2.6 Nachsorge	22
1.3 Zielstellung dieser Arbeit	24
2. Materialien.....	26
2.1 Chemikalien.....	26
2.2 Puffer und Lösungen	27
2.3 Kits/Enzyme	28
2.4 Oligonucleotide	28
2.5 Geräte.....	30
2.6 Verbrauchsgegenstände	31
2.7 Zelllinien.....	31
2.8 Patientenmaterial	32
3. Methoden.....	33
3.1 Grundlegende Methoden im Umgang mit den Proben.....	33
3.1.1 Umgang mit dem Probenmaterial.....	33
3.1.2 Probenaufbereitung.....	33

3.1.3 RNA-Extraktion	34
3.2 Zellkulturarbeiten	35
3.2.1 Auftauen von Zellen	35
3.2.2 Zellsplitting.....	35
3.2.3 Mykoplasmentest.....	36
3.2.4 Zellernte.....	36
3.2.5 Einfrieren der Zellen.....	36
3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	36
3.3.1 Grundlegendes Prinzip der PCR.....	36
3.3.2 Primerdesign.....	37
3.3.3 Gelelektrophorese.....	38
3.3.4 Semi-nested und nested PCR.....	38
3.3.5 APOT-PCR.....	42
3.3.6 β -Aktin PCR	46
3.3.7 HPV 16-PCR	47
3.4 Southern Blot und Hybridisierung.....	48
3.5 Identifizierung der molekularen Marker.....	50
4. Ergebnisse.....	52
4.1 Vorversuche zur Sensitivität der TS-PCR.....	52
4.1.1 Zellkulturarbeiten	52
4.1.2 Sensitivitätstest mit Hilfe einer semi-nested-PCR und Oligohybridisierung	53
4.2 Aufbereitung und Untersuchung der Tumorbiopsien.....	54
4.2.1 Probenakquirierung und Aufbereitung des Probenmaterials.....	54
4.2.2 APOT-PCR.....	57
4.3 Sequenzierung und Etablierung molekularer Marker.....	59
4.4 Validierung der molekularen Marker an cDNA	62
4.4.1 Probe zu Patient Nummer 28.....	62
4.4.2 Probe zu Patient Nummer 33.....	63
4.5 TS-PCR an RNA der präoperativen Abstriche.....	65
4.5.1 TS-PCR Patient Nummer 28	65

4.5.2 TS-PCR Patient Nummer 33	67
4.6 TS-PCR an RNA der postoperativen Abstriche und Blutproben	69
4.7 Ergebnisse der HPV 16-PCR.....	71
4.8 Screening aller prä-operativen Abstriche	73
5. Diskussion	76
5.1 Konservierung und Aufbereitung des Probenmaterials.....	76
5.2 Prävalenz von HPV Typ 16 im untersuchten Probenmaterial	77
5.2.1 Untersuchung der präoperativen Abstriche auf HPV 16.....	78
5.3 Ergebnisse der APOT-PCR	79
5.4 Ergebnisse der Tumor-spezifischen PCR.....	83
5.4.1 Spezifität und Sensitivität der tumorspezifischen PCR.....	83
5.4.2 Anwendung der TS-PCR an Patientenmaterial	84
6. Schlussfolgerungen.....	87
Literaturverzeichnis.....	88
Anhang	99

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APOT-PCR.....	Amplification of Papillomavirus Transcript-PCR
ATP.....	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA.....	komplementäre DNA
CT	Computertomographie
CTC	zirkulierende Tumorzellen
ctDNA.....	zirkulierende Tumor-DNA
dsDNA.....	doppelsträngige DNA
DMEM.....	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP.....	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR.....	epidermal growth factor receptor
FCS	fetales Kälberserum
HNC.....	Head and Neck Cancer
HNSCC.....	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
HR-HPV	High risk HPV
kb	Kilobasenpaare
LCR	Long control region
LR-HPV	Low risk HPV
MRT	Magnetresonanztomographie
neg.	negativ
NTC	Non Template control
ORF	Open Reading frame
OSCC.....	Oral Squamous Cell Carcinoma
PBS.....	phosphate buffered saline
PCR.....	Polymerase Kettenreaktion
P/S.....	Penicillin/Streptomycin

rpm.....	rounds per minute
RNA.....	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real Time-PCR
SDS.....	Sodium Dodecyl Sulfat
SSC	Standard saline citrate
ssDNA	einzelsträngige DNA
T _A	Annealing-Temperatur (in °C)
T _m	Schmelztemperatur (in °C)
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TS-PCR.....	Tumor-spezifische PCR
UICC.....	Union internationale contre le cancer

Zusammenfassung

Risikofaktoren für die Entstehung eines Kopf- und Halstumors (head and neck squamous cell cancer, HNSCC) sind hauptsächlich exogene Noxe wie Rauchen und Alkohol (Blot et al. 1988). In den letzten Jahren kristallisierte sich allerdings eine weitere Entität heraus: HPV-assoziierte Tumore. Diese unterscheiden sich von den durch Nikotin und Alkohol verursachten Tumoren in Überlebensraten, Ansprechen auf Therapeutika und stellen einen eigenen Prognosefaktor dar (Ang et al. 2010). Betroffen sind vor allem maligne Entartungen des Oropharynx (Oral squamous cell cancer, OSCC), zu denen Tonsillenkzinome als Untergruppe gehören (Gillison et al. 2000). Die Detektionsraten HPV-positiver Tumore reichen bei dieser Subgruppe der HNSCC von etwa 25% bis hin zu 85% (Herrero et al. 2003, Glombitza et al. 2010, Nasman et al. 2009). Des Weiteren wird über eine zunehmende Inzidenz von HPV bei OSCC, besonders dem Tonsillenkzinom berichtet (Chaturvedi et al. 2011). Der hauptsächlich detektierte HPV-Typ ist HPV 16 (Hammarstedt et al. 2006).

Der Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und Karzinogenese ist am besten beim Zervixkarzinom erforscht. Hierbei kommt es häufig zur Integration des viralen Genoms in das zelluläre Genom und damit zur Bildung eines tumorspezifischen Fusionstranskript (Klaes et al. 1999). Es ist bekannt, dass es auch in Tonsillenkzinomen zur Integration des Virusgenoms kommen kann, auch wenn dessen Bedeutung weiterhin unklar ist (Schumann 2012). So genannte viral-zelluläre Fusionstranskripte sind hochspezifisch für einen Tumor. Sie können somit als Patienten-spezifischer molekularer Marker in der Verlaufskontrolle bei Patienten mit Tonsillenkzinom genutzt werden.

Bisher gibt es keine standardmäßigen Marker zur Verlaufskontrolle von Tumorpatienten. Ein Rezidiv fällt erst auf, wenn es makroskopisch sichtbar und damit bereits groß ist. Für Patienten mit einem Rezidiv ist die Prognose sehr schlecht (Gibson et al. 2005). Ziel dieser Arbeit ist eine Etablierung molekularer Marker zur frühzeitigen Erkennung eines lokalen Rezidivs und damit die Verbesserung der Patientenversorgung.

Mit Hilfe der APOT-PCR (Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcript-PCR) wurden zuerst 38 Tumorbiopsien aus Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx und der Tonsille auf den HPV-Status untersucht. Nach Etablierung viral-zellulärer Fusionstranskripte als molekulare Marker konnten in einem zweiten Schritte präoperative Abstriche mittels Tumor-spezifischer PCR (TS-PCR) auf diese molekularen Marker hin untersucht werden. Die TS-PCR ist eine hoch-spezifische und sensitive Methodik um viral-

zelluläre Fusionstranskripte nachzuweisen. Im postoperativen Verlauf wurden außerdem Abstriche und Blutproben ausgewählter Patienten zu verschiedenen Kontrollpunkten mittels TS-PCR untersucht.

Von insgesamt 38 untersuchten Tumorbiopsien zeigten sich 9 positiv für HPV 16, in zwei Fällen ließ sich ein viral-zelluläres Fusionstranskript nachweisen. Für diese zwei Patienten konnten molekulare Marker etabliert und validiert werden. Mittels TS-PCR konnten diese Marker auch in präoperativen Abstrichen nachgewiesen werden. Postoperative Abstriche sowie Blutproben blieben hingegen, bei fehlendem Lokalrezidiv, negativ.

Insgesamt gelang ein „proof-of-principle“. Zellen eines HPV-positiven Tonsillenkarzinomes mit viral-zellulären Fusionstranskript sind in Abstrichen außerhalb des Tumorverbandes als einzelne Zellen nachweisbar. Die Nachweismethodik ist dabei sehr sensitiv und spezifisch.

Es handelt sich hierbei um einen erfolgsversprechenden Ansatz, um einem Teil der Patienten eine bessere Versorgung und Kontrolle anbieten zu können.

1. Einleitung

Die Erkenntnis, dass Viren in der Lage sind, benigne und maligne Tumore auszulösen, ist nicht neu. Tatsächlich stellte der Bakteriologe Amédée Borrel schon 1903 die Vermutung auf, dass Krebserkrankungen auf Virusinfektionen rückzuführen sein könnten (Borrel 1903, reviewed in McAllister 1965). Bis 1950 konnte bereits in mehreren Projekten gezeigt werden, dass durch die Injektion zell-freier Filtrate aus dem Blut kranker Tiere Krebs auf gesunde Tiere sozusagen „transferiert“ werden kann (Rous 1911, Lucke 1938). Noch fehlten natürlich die Möglichkeiten, wie zum Beispiel Elektronenmikroskopie, um dieses Phänomen auch darzustellen. So konnten erst 1956 Viruspartikel in renalen Adenoidkarzinomen nachgewiesen werden (Fawcett 1956). Es sollte aber noch lange dauern, bis Viren als Tumorinduktor wahrgenommen wurden.

Inzwischen gibt es mehrere, sowohl RNA- als auch DNA-Viren, deren Verbindung mit Tumorentstehung untersucht wurde, zum Beispiel Hepatitisvirus – hepatozelluläre Karzinom, Epstein-Barr-Virus – Lymphome, Humanes Herpesvirus Typ 8 – Kaposi Sarkom oder auch Humane Papillomavirus – Zervixkarzinom.

Für das Jahr 2008 konnten weltweit 16,1 % der Krebsfälle auf eine Infektion zurückgeführt werden, davon ein Großteil auf virale Infektionen. In Entwicklungsländern ist der Anteil an durch chronische Infektionen ausgelöste Tumore höher (22,9 %) als in Industrieländern (7,4 %) (de Martel et al. 2012).

Tatsächlich ist es so, dass eine Virusinfektion nicht zwangsläufig zu einer Tumorentstehung führt. Manchmal muss die Infektion außerdem von weiteren Umständen begleitet werden, wie zum Beispiel Immuninsuffizienz, genetischer Disposition oder somatischen Mutationen. Der Zusammenhang zwischen viralen Infektionen und Krebsentstehung ist allerdings ein gänzlich neuer Ansatz sowohl für die Prävention als auch für die Behandlung von Karzinomen und eröffnet neue Perspektiven im Umgang mit der Erkrankung.

1.1. Humanes Papillomavirus

Das Humane Papillomavirus (HPV) ist ein kleines, unbehülltes, ikosaederförmiges DNA-Virus, welches zur Familie der Papillomaviren gehört. Papillomaviren wurden in nahezu allen Säugetieren und Vögeln gefunden, wobei HPV am besten untersucht ist. Papillomaviren sind epitheliotrop und befallen muköse und kutane Epithelien. Sie verhalten sich dabei streng spezie-spezifisch. Beispiele sind die Bovinen Papillomaviren

beim Rind oder Cottontail Rabbit Papillomaviren beim Kaninchen. Bis heute sind etwa 170 Genotypen von HPV bekannt und sequenziert. Sie verursachen meist gutartige, in manchen Fällen aber auch bösartige Tumore (Zheng und Baker 2006).

1.1.1 Genom und Proteine

Das Genom des HPV besteht aus einer etwa 8000 bp großen, zirkulären, doppelsträngigen DNA, die für acht Proteine auf drei Open Reading Frames (ORF) kodiert (siehe Abb. 1).

Es gibt drei Regionen auf der DNA: Die Region der Early-Proteine nimmt etwa 50 % davon ein und codiert für die Proteine E1 – E7. Nachfolgend liegt die Region der Late-Proteine, die etwa 40 % des Genoms ausmacht und für L1 und L2 codiert. Des Weiteren befindet sich auf dem Genom ein 850 bp großer Abschnitt nicht-kodierender DNA („LCR“-„Long control region“). Dieser Teil enthält cis-Elemente, die die Replikation und Transkription der viralen DNA beeinflussen können (Zheng und Baker 2006). Auf dem HPV 16-Genom liegen zwei Promotoren: p 97 und p 670 (Grassmann et al. 1996), bei anderen HPV-Typen können diese an anderer Stelle liegen.

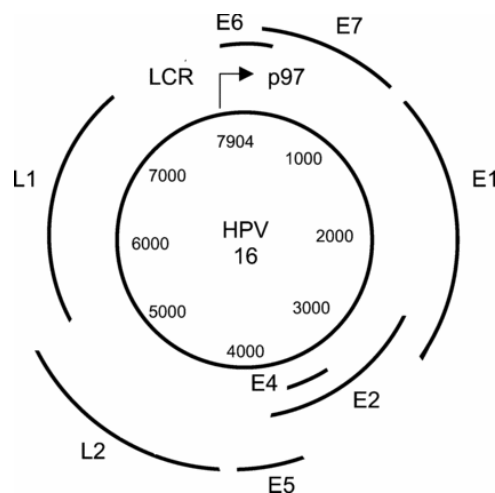


Abb. 1: HPV 16-Genom; nicht eingezeichnet: p 670-Promoter; (Crosbie und Kitchener 2006)

Zu den Early-Proteinen (E-Proteine) gehören die Proteine E1, E2, E4 – E7.

E1 und E2 sind regulatorische Proteine. E5, E6 und E7 sind die Onkogene des HPV. Im Zusammenhang mit der Karzinogenese sind vor allem die Mechanismen von E6 und E7 gut untersucht. Sie interagieren mit Regulatoren des Zellzyklus, jeweils mit den Tumorsuppressoren p 53 und Rb, und führen zum Funktionsverlust dieser (Kessis et al. 1993, Dyson et al. 1989). E5 scheint im Zusammenspiel mit E6 und E7 die

Zelltransformation und Wachstumsfaktoren zu beeinflussen (Straight et al. 1993, Krawczyk et al. 2008).

Bei den Late Proteinen L1 und L2 handelt es sich um Strukturproteine, die am Aufbau des viralen Kapsids beteiligt sind. L1-Proteine sind hochkonserviert. Die hierfür codierende DNA spielt eine wichtige Rolle bei der Typisierung der Papillomaviren. Gleichzeitig sind sie mit 360 Molekülen auch die Hauptproteine des Kapsids. L2-Proteine hingegen bestehen nur aus 72 Molekülen. Beide Proteine bilden die äußere Hülle des Virus.

1.1.2 Klassifizierung

Papillomaviren werden anhand des L1-Gens typisiert. Die Gensequenz dieses Proteins ist die am besten konservierte der Papillomaviren. Ein neuer Typ wird erst dann als solcher erkannt, wenn das komplette Genom geklont und die DNA sequenziert wurde und dabei festgestellt wird, dass sich die L1-Sequenz um 10 % von dem am nächsten bekannten Typ unterscheidet. Beträgt der Unterschied zwischen 2 und 10 %, so spricht man von einem Subtyp. Bei einer Differenz von unter 2 % liegt lediglich eine Variante vor. Diese Definition wird seit 1995 anerkannt und angewandt (reviewed in de Villiers 2013).

Die verschiedenen HPV werden nach genetischer Ähnlichkeit in alpha-, beta-, gamma-, nu- und mu-Papillomaviren eingeteilt. Des Weiteren unterscheidet man noch nach onkogenem Potential in low-risk-Viren (LR-HPV) und high-risk-Viren (HR-HPV). Die Kategorisierung erfolgt hierbei rein epidemiologisch. Der Großteil der HPV gehört zu ersterer Gruppe. Am häufigsten sind HPV 6 und 11. Zu den high-risk-Viren gehören 15 Typen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82. Typ 26, 53 und 66 sind wahrscheinlich auch in dieser Gruppe anzuordnen (Munoz et al. 2003).

1.1.3 Infektionsverlauf

HPV sind auf proliferierendes Gewebe angewiesen. Das HPV ist dabei streng epitheliotrop.

Zu einer Infektion mit HPV kommt es durch Mikrowunden im Epithel, die es dem Virus ermöglichen, bis zu den Basalzellen und der Basalmembran durchzudringen und diese zu infizieren. Ist das Epithel intakt, so ist eine Infektion sehr unwahrscheinlich (Roberts et al. 2007). Ähnlich anderer Viren müssen HPV in den Intrazellularraum gelangen, um sich replizieren zu können. Sie sind auf den Transkriptions- und Replikationsapparat der Zelle angewiesen, da sie diese selbst nicht im vollen Umfang besitzen. Der Mechanismus von der Anlagerung des Virus bis hin zu intrazellulären Prozessen ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt.

Eine Rolle bei der Aufnahme des Virus spielen wohl Interaktionen zwischen Zellrezeptoren und Strukturen auf dem Viruskapsid. Primäre Zellrezeptoren für mehrere Typen von HPV, unter anderen HPV 16 und 33, sind die Heparan-Sulfat-Proteoglykane. Sie sind ein wichtiger Bestandteil tierischer Zellen, der Basalmembranen sowie der extrazellulären Matrix und spielen bei der Bindung von HPV eine wichtige Rolle (Giroglou et al. 2001). In vivo scheint die Basalmembran die erste Station für das Virus zu sein, bevor es die Basalzellen infiziert. In der Zelle findet der Prozess des Uncoating statt, so dass das genetische Material vervielfältigt und verwendet werden kann.

Die DNA wird anfangs ca. 50 – 100-mal repliziert und liegt episomal vor. Die Viren müssen das Milieu einer sich teilenden Zelle aufrechterhalten. Dies ist die Aufgabe der beiden Hauptonkogene E6 und E7. Ihre Wirkmechanismen sind gut untersucht.

Das Protein E6 interagiert mit p 53, einem Tumorsuppressor, und unterdrückt dessen Funktion (Kesis et al. 1993). Als Tumorsuppressor kann p 53 im Falle von zellulärem Stress oder Schaden aktiviert werden (Kastan et al. 1991) und über Signalkaskaden in den Zellzyklus eingreifen. So wird der Zellzyklus gestoppt und in manchen Fällen die Apoptose eingeleitet. Dies verhindert ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen und eine Tumorentstehung. In vielen Tumoren, abhängig vom Subtyp, ist p 53 nicht mehr funktionsfähig (Greenblatt et al. 1994). Neben diesem Wirkmechanismus wurden noch andere Zellmechanismen beschrieben, die E6 beeinflussen kann, zum Beispiel Telomerase-Aktivierung (Klingelhutz et al. 1996) oder der Rap small-G-Protein Signalweg (Singh et al. 2003).

E7 greift an einem weiteren Protein an, dem Retinoblastoma-Protein (Rb) (Dyson et al. 1989). Auch hierbei handelt es sich um ein Tumorsuppressor. Es bildet im hypophosphoryliertem Zustand einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F und kann so den Zellzyklus in der G1-Phase blockieren. Das E7-Gen-Produkt kann diesen Komplex zerstören. Die Hemmung für den Transkriptionsfaktor entfällt (Pagano et al. 1992). E7 kann allerdings auch mit weiteren Proteinen interagieren, zum Beispiel mit p 107 oder p 130 (Shin et al. 2012).

Die beiden Onkogene sorgen so für die Möglichkeit einer Replikation der viralen DNA auch in nicht-teilenden Zellen. Es kommt zu genetischer Instabilität, verminderter Apoptosefähigkeit und unzureichender Kontrolle des Zellzyklus. Reguliert werden können sie durch Genprodukte von E2 (Nishimura et al. 2000).

Mit zunehmender Proliferation und Differenzierung der Keratinozyte kommt es zu einer Hochregulation der Virus-DNA-Replikation bis zu vieler 1000 Kopien. In der obersten

Schicht des Epithels werden die Late-Proteine produziert und das genetische Material der Viren verpackt. Die Viren können dann als infektiöse Partikel die Zelle verlassen (siehe Abb. 2). Da die Viren mit der Keratinozyte von Basalmembran bis in die oberste Schicht mitwandern, dauert ein Infektionszyklus etwa 3 Wochen.

Das virale Genom kann in zwei Formen in der Zelle vorliegen: integriert in das zelluläre Genom oder nicht integriert. Zu Beginn der Infektion liegt das virale Genom in episomaler, also nicht integrierter, Form vor. Im Laufe einer persistierender Infektion und Läsion steigt die Wahrscheinlichkeit einer Integration (Klaes et al. 1999). Dieser Schritt scheint ein wichtiges Ereignis in der Onkogenese zu sein. Es gibt sogenannte Hotspots, in denen Integrationen gehäuft vorzufinden sind. Die genaue Integrationsstelle ist jedoch bei jedem Tumor unterschiedlich (Schmitz et al. 2012). Der Bruchpunkt liegt dabei meistens im E1- oder E2-Gen (Cricca et al. 2009).

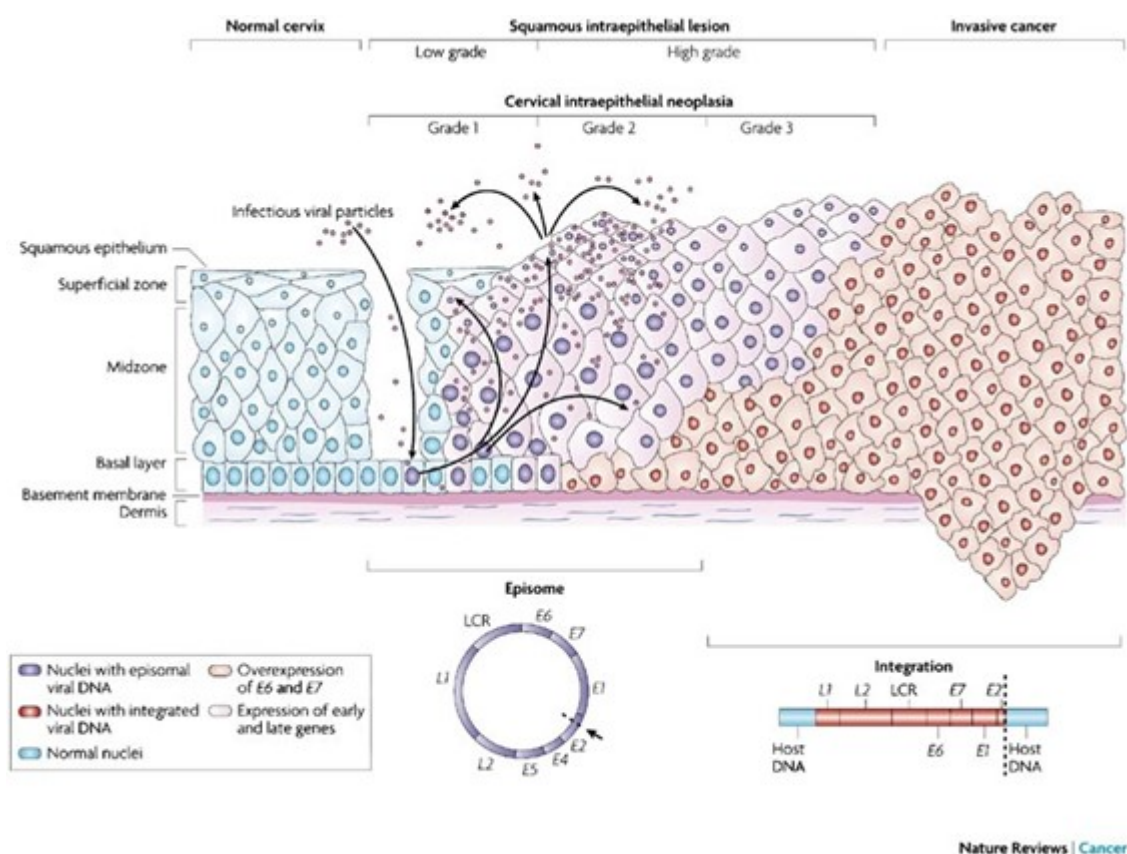


Abb. 2: Infektionsverlauf bei persistierender Infektion mit HPV bis hin zum invasiven Karzinom (Woodman et al. 2007)

Der Infektionsablauf ist in Abb. 2 beispielhaft am Zervixepithel dargestellt. Für das Zervixkarzinom ist der Zusammenhang HPV–Karzinogenese am besten erforscht und untersucht.

Eine Infektion mit HPV kann ohne ärztliches Eingreifen wieder abheilen. Die mediane Dauer einer Infektion mit dem Virus ist hierbei 8 Monate, wobei die längste Abheilungsdauer bei den HR-HPV 16 und 18 beobachtet wird (Ho et al. 1998). Diese beiden Virus-Typen werden auch am häufigsten in Zervix Karzinomen nachgewiesen. Heilt die Infektion nicht ab, kann es zu chronischen Gesundheitsproblemen kommen.

1.1.4 HPV-assoziierte Krankheiten

Das Humane Papillomavirus kann sowohl maligne als auch benigne Erkrankungen im Menschen auslösen.

Dabei werden benigne Erkrankungen vor allem durch LR-HPV verursacht. Hierzu gehören zum Beispiel Genitalwarzen, die meist durch HPV 6 oder 11 verursacht werden (Grce et al. 2000). Im Genitalbereich kommt es zur Entstehung von Condylomata acuminata (Feigwarzen). Diese sind für den Menschen zwar unangenehm aber soweit nicht lebensbedrohlich. Aber auch im oropharyngealen Bereich können HPV benigne Tumore verursachen. Dazu gehören Warzen, Condylomata oder die laryngeale Papillomatosis, die ebenfalls durch HPV 6 und 11 hervorgerufen wird (Bonagura et al. 2010). Die laryngeale Papillomatosis kann durch Verlegung der Atemwege durchaus auch lebensbedrohlich werden, ist aber kein maligner Tumor.

Mindestens 15 Typen von HPV sind als HR-HPV anzusehen (Munoz et al. 2003). Diese können die Karzinomentstehung in Epithelien an verschiedenen Stellen des Körpers begünstigen, wenn die Infektionen persistieren. Etabliert ist der Zusammenhang zwischen HR-HPV und den anogenitalen Karzinomen und deren Vorstufen. Es gibt epidemiologische Hinweise auf eine Rolle des Virus bei Karzinomen von Vulva, Vagina und Anus (De Vuyst et al. 2009). In fast jedem Zervix Karzinom ist ein HR-HPV-Typ detektierbar (Walboomers et al. 1999). Das Humane Papillomavirus als Auslöser dieser Tumorentität ist heute breit anerkannt und akzeptiert.

In den letzten Jahren mehren sich zusehends die Hinweise, dass auch zwischen Untergruppen maligner Tumore des Oropharynx und HPV (vor allem Typ 16) ein kausaler Zusammenhang besteht. Dieser Punkt ist unter dem Kapitel Ätiologie der Tonsillenkarcinome beschrieben.

1.2 Tonsillenkarzinom

1.2.1 Anatomie und Funktion der Tonsilla palatina

Die paarige Tonsilla palatina (Gaumenmandel) liegt am Übergang von Mund zu Pharynx zwischen dem Arcus palatoglossus und dem Arcus palatopharyngeus. Wie die drei weiteren Tonsillen im Mund-Rachenbereich (Tonsilla pharyngea, Tonsilla tubaria und Tonsilla lingualis) gehört auch sie zu einem Ring aus lymphatischen Gewebe, dem Waldeyer'schen Rachenring, benannt nach dem Erstbeschreiber Waldeyer (1884, reviewed in Perry und Whyte 1998). Jede Tonsille an sich bildet demzufolge ein sekundär lymphatisches Organ und spielt eine wichtige Rolle in Antigenerkennung und Immunantwort. Der lymphatische Ring kann zu dem System der Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT-Mucosa associated lymphatic tissue) gezählt werden, zu dem auch die Peyer-Plaques und der Processus vermiformis im Darm gehören.

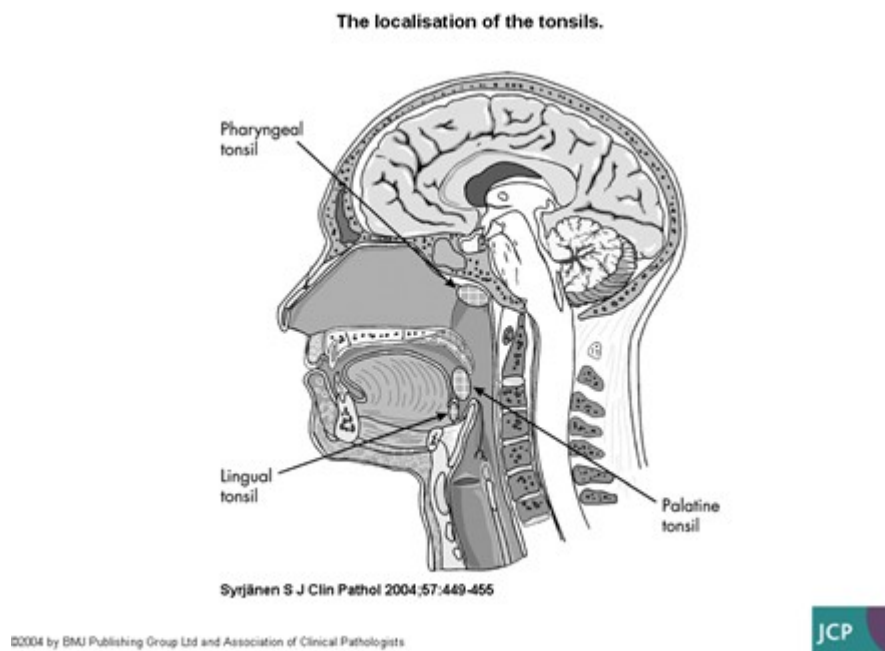


Abb. 3: Anatomische Lage der Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenringes (nach Syrjänen 2004)

Anatomisch betrachtet gehört die Tonsilla Palatina zum Oropharynx und bildet dessen anteriore Grenze (siehe Abb. 3, hier nicht abgebildet: Tonsilla tubaria). Nach lateral wird die Tonsille durch eine unvollständige Bindegewebskapsel vom Pharynx abgegrenzt. Auf der medialen Seite wird das Lymph- und Bindegewebe von einem mehrschichtig

unverhorntem Plattenepithel bedeckt (Nummer 1 in Abb. 4). Auf dieser Seite befinden sich außerdem 10–30 Krypten (Nummer 3 in Abb. 4), Vertiefungen des Epithels in die Lamina propria, die die Oberfläche der Tonsilla vergrößern.

Aufgrund der Lage kommen die Tonsillen bereits sehr frühzeitig mit Antigenen aus der Umwelt in Kontakt, die sowohl durch Nahrung als auch über die Luftwege aufgenommen werden und auf diesem Weg in den Körper eindringen. Antigene werden durch im Kriptenepithel befindliche M-Zellen aufgenommen und transzytotisch an die Lymphozyten und Lymphfollikel (Nummer 2 in Abb. 4) geleitet, wo eine Immunantwort ausgelöst werden kann (Gebert 1995).

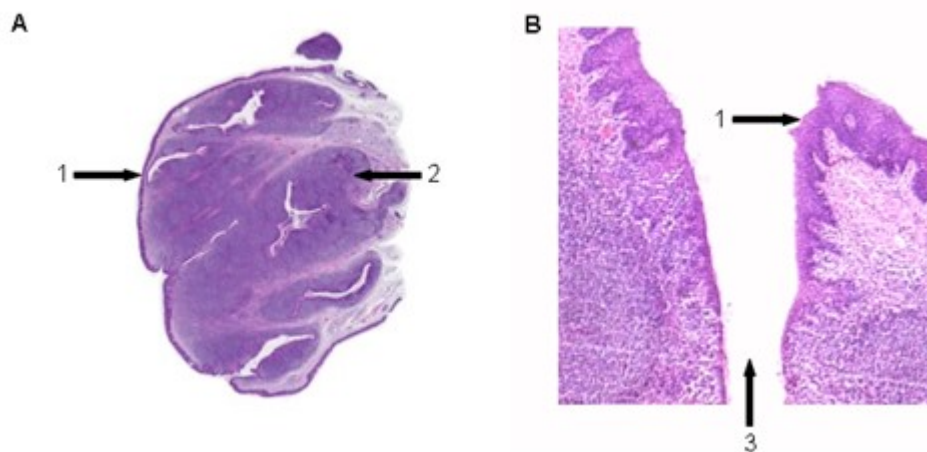


Abb. 4: Mikroskopisches Bild der Tonsilla palatina in Übersicht (A) und 5x Vergrößerung (B); HE-Färbung; (Quelle: <http://anatomie.net/histowebatlas/n-117.htm>, modifiziert)

Die Blutversorgung der Tonsillae palatinae erfolgt durch Äste der Arteria carotis externa, genauer gesagt durch aufsteigende Äste der Arteria palatina oder Äste der Arteria facialis, sowie durch die Lingualarteria und aufsteigenden Pharynxästen. Die venöse Drainage geschieht in parallel laufenden Venen.

Die Lymphe aus den Tonsillen drainiert in die Halslymphknoten. Die Halslymphknoten sind in mehrere Gruppen, sogenannte Level, eingeteilt (Robbins et al. 2008). Lymphflüssigkeit der Tonsilla palatina fließt dabei vor allem in Gruppe II und in die retropharyngealen Lymphknoten ab.

1.2.2 Epidemiologie und Klassifikation

Tonsillenkarcinome gehören zu den Oropharynxkarzinomen (OSCC, Oral Squamous Cell Carcinomas), werden im ICD-10-Katalog allerdings als eigenständige Gruppe geführt (C09). Mit den Karzinomen der Mundhöhle, des Larynx, des Naso- und Hypopharynx, der Kopfspeicheldrüsen und der Trachea werden sie zur großen Gruppe der Kopf-Hals-Tumore (HNC, Head-Neck-Cancers) zusammengefasst. Obwohl die einzelnen Tumore durch bestimmte Charakteristika verbunden sind, handelt es sich hierbei doch um eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren, weswegen eine Unterscheidung hinsichtlich Diagnostik, Therapie und Nachsorge sinnvoll ist.

Die Inzidenz der Tumore von Mundhöhle und Rachen (C0 – C14 laut ICD 10-Katalog) beträgt weltweit 529.451 (7,5 pro 100.000), in Deutschland 15.891 (19,4 pro 100.000) (Ferlay J 2012). In Deutschland stehen sie an 11. Position maligner Neuerkrankungen, an 6. Stelle bei Männern, an 15. Stelle bei Frauen.

Von 12.940 Neuerkrankungen an malignen Tumoren der Mundhöhle und Rachen (C0 – C14) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2012 gehörten 1705 Fälle zu den Tonsillenkarcinomen, also etwa 13,2 %. Dabei sind Männer 3–4 x häufiger von der Krankheit betroffen als Frauen (1.280 versus 425 Neuerkrankungen 2012). Die Mortalität betrug 374 in absoluten Zahlen. Betroffen ist vor allem die Altersgruppe zwischen 50 und 75 Jahren (Robert-Koch-Institut, Stand 07.11.2016).

Tonsillenkarcinome werden wie andere Tumore und Karzinome auch nach der TNM-Klassifikation eingeteilt (siehe Anhang, Tabelle 13). Davon ausgehend können noch UICC-Stadien unterschieden werden. Die Stadien spielen im weiteren Verlauf eine Rolle bei Therapieentscheidungen.

1.2.3 Ätiologie

Die Hauptrisikofaktoren für Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches, also auch für Tonsillenkarcinome, bleiben weiterhin Alkoholkonsum und Nikotinabusus (Blot et al. 1988). Vor allem in Kombination beider liegt ein erhöhtes Risiko vor. Noch etwa 70 % aller Karzinome in diesem Bereich können durch einen dieser beiden Faktoren erklärt werden (Hashibe et al. 2009). Daneben ist auch schlechte Mundhygiene ein von Tabakgenuss und Alkoholkonsum unabhängiger Faktor, der das Entstehen von malignen Tumoren begünstigen kann. Dazu gehören außerdem schlechter Zahnzustand und schlechter Zustand des Mundes, unregelmäßiges bis gar kein Benutzen einer Zahnbürste, sowie unregelmäßige bis fehlende regelmäßige Zahnuntersuchung (Guha et al. 2007).

Ebenso kann eine entsprechende Familiengeschichte ein Risiko darstellen. Unklar ist, ob das erhöhte Risiko innerhalb einer Familie tatsächlich genetisch bedingt oder doch eher auf ähnliche Verhaltensmuster (zum Beispiel Tabakkonsum) zurückzuführen ist (Negri et al. 2009). Ob eine genetische Prädisposition bestehen kann, ist bis dato noch nicht ausreichend erforscht.

Untersuchungen und Studien deuten inzwischen daraufhin, dass noch ein weiterer Faktor die Entstehung von Oropharynxkarzinomen, insbesondere Tonsillenkarzinomen, begünstigt: das Humane Papillomavirus. Es ist vor allem bekannt als Auslöser des Zervixkarzinomes und stellt damit einen weiteren wichtigen Prädiktor für Tonsillenkarzinome dar. Der Faktor ist unabhängig von Tabak- und Alkoholkonsum. So erkranken eher Nichtraucher an HPV-positiven Karzinomen (Habbous et al. 2014). Wie beim Zervixkarzinom scheint das Virus auf sexuellem Weg übertragen zu werden und ein Zusammenhang zwischen Sexualverhalten und HPV-Status des Tumors zu bestehen (Gillison et al. 2008).

Schon 1985 gab es Versuche, die HPV in Plattenepithelkarzinomen des Mund-Rachen-Raumes nachwiesen (Loning et al. 1985, de Villiers et al. 1985). In den folgenden Jahren wurden viele Studien durchgeführt, die den Verdacht der HPV-Involvierung bei Kopf-Hals-Tumoren verfestigten. In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2005 (60 Studien aus 26 Ländern von 1991 bis 2004 – insgesamt 5046 Fälle) waren 26 % aller Kopf-Hals-Tumore HPV-positiv. Die Detektionsrate von HPV bei Tonsillenkarzinomen war signifikant höher als bei Oral- oder Laryngealtumoren (36 % versus jeweils 24 %) (Kreimer et al. 2005). In einer schwedischen Studie aus dem Großraum Stockholm konnte HPV 16-DNA in 85 % der Fälle von Tonsillenkarzinom detektiert werden. Ferner konnte ein signifikanter Anstieg der Zahl HPV-positiver Tonsillenkarzinome seit den 70er Jahren beobachtet werden (Nasman et al. 2009). In weiteren Studien wurde ein hoher Anteil an HPV-positiven Tonsillenkarzinomen bestätigt (zum Beispiel Rotnáglová et al. 2011, Glombitza et al. 2010). HPV, vor allem Typ 16, gilt deshalb heute als etabliertes Karzinogen für Kopf-Hals-Karzinome. Dem entgegengesetzt wiesen in einer Studie von Herrero et al. nur ca. 25 % der Tumore HPV auf (Herrero et al. 2003). Mit ca. 95 % ist HPV 16 der am häufigsten auftretende Typ beim Tonsillenkarzinom (Herrero et al. 2003).

Zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tonsillenkarzinomen bestehen Unterschiede. Bei Erstvorstellung haben Patienten mit HPV-positivem Tumor häufiger Lymphknotenmetastasen, aber auch ein niedrigeres T-Stadium als Patienten mit HPV-negativen Tumoren (Ward et al. 2014). Die Differenzierung der Tumore ist schlechter.

Patienten mit HPV-positivem Karzinomen haben allerdings ein besseres Outcome als Patienten mit HPV-negativen Tumoren. Die Ansprechraten auf Chemotherapien scheinen besser zu sein (Fakhry et al. 2008). Auch für die Radiotherapie gibt es Hinweise für eine höherer Sensitivität bei HPV-positiven Tumoren (Kimple et al. 2013).

1.2.4 Diagnose und Krankheitsverlauf

Da eine Erkrankung mit Tonsillenkarcinomen lange asymptomatisch verläuft und die Tumore von außen schlecht erreichbar und sichtbar sind, wird eine Diagnose meist erst sehr spät gestellt. Nur wenige Patienten kommen bereits im Frühstadium mit (vagen) Symptomen und leichten Läsionen, zum Beispiel weißen Plaque oder kleinen Wunden, zum Arzt. Zu diesem Zeitpunkt ist auch eine eindeutige, korrekte Diagnose schwer zu stellen. Ein Tonsillenkarcinom im Frühstadium ist meist ein Zufallsbefund. Etwa 70 % der Patienten mit Oropharynxkarzinom stellen sich erst im Spätstadium (T3 und T4) beim Arzt vor (Vernham und Crowther 1994). Dies liegt vor allem an vorerst unspezifischen Symptomen. Viele Patienten schreiben diese einer Erkältung oder Infektion zu oder denken an Probleme im Zahnbereich. Ein Großteil empfindet die Symptome einfach nicht als bedrohlich, ignoriert sie, traut sich nicht zum Arzt oder denkt gar nicht an die Möglichkeit, dass eine ernsthafte Erkrankung hinter den Symptomen stecken kann (Brouha et al. 2005). Die Gründe, die letztendlich zu einem Arztbesuch führen, sind andauernde und verschlimmernde Symptome: Schluck- und Kaubeschwerden, Schmerz, Ulcera, Sprachprobleme, Blutungen, Halsschwellungen, Lymphknotenvergrößerungen und Gewichtsverlust gehören unter anderem dazu (Koivunen et al. 2001).

Die Diagnose der Karzinome im Spätstadium beeinflusst die Prognose unabhängig von der Therapie negativ. Dabei sind Tonsillenkarcinome bei frühzeitiger Diagnose sogar heilbar. Liegt ein Karzinom im T1-Stadium vor, so ist die 5-Jahres-Überlebensrate 50 %. Bei den Stadien T3 und T4 beträgt diese nur 30 % (Perez et al. 1998). Die 3-Jahres-Überlebensrate bei Tumoren, die im T1-Stadium diagnostiziert und behandelt wurden, beträgt 90 %, bei T4-Karzinomen 60 % (Aziz et al. 2010). Die Tumorgöße beeinflusst auch die Wahrscheinlichkeit eines Lokalrezidivs im weiteren Verlauf der Krankheit. Bei T1-Tumoren beträgt die Rezidivfreiheit (lokal) nach 5 Jahren immerhin 88 %, bei T2 nur noch 84 %, bei T3 78 % und bei T4 lediglich 61 % (Mendenhall et al. 2006). Ob auch der Lymphknotenbefall die Prognose beeinflusst, ist umstritten. Es gibt sowohl Studien die dafür sprechen (Perez et al. 1998, Setton et al. 2012), als auch Studien die gegenteiliges behaupten (Aziz et al. 2010).

Die meisten Patienten haben bereits lymphogene Metastasen, vor allem in ipsilateralen Lymphknoten Level II und III, wenn sie sich beim Arzt vorstellen (Chung et al. 2011). Hämatogene Metastasen befinden sich vor allem in Lunge, seltener in der Leber, und treten bei 10-20 % der Fälle auf. Auch die Wahrscheinlichkeit eines Metastasen-freien Überlebens ist abhängig vom Tumorstadium. Nach 5 Jahren beträgt dieses bei einem behandeltem Tumor Stadium I 100 %, bei Stadium IVB nur noch 86 % (Mendenhall et al. 2006).

Um ein Tonsillenkarzinom zu diagnostizieren, sollte zuerst eine körperliche Untersuchung mit Inspektion und Palpation stattfinden. Auch Spiegeluntersuchungen und Endoskopien können angewandt werden. Außerdem sollte der Lymphknotenstatus im Hals-Kopf-Bereich sowie eventuelle Fernmetastasen erfasst werden. Bildgebende Verfahren können bei der Diagnose helfen. Gerade ein Röntgen-Thorax oder CT/MRT-Thorax kann Fernmetastasen aufspüren. Erst eine Biopsie mit histologischer Begutachtung, die immer nach den bildgebenden Verfahren durchgeführt werden sollte, kann vollkommene Gewissheit bringen. Diese wird, wenn möglich, vom Primärtumor entnommen.

1.2.5 Therapie

Die Therapie des Tonsillenkarzinoms ist abhängig von Stadium des Tumors und Komorbiditäten des Patienten.

Prinzipiell stehen drei Behandlungsmethoden und deren Kombination zur Verfügung: Resektion des Tumors (operativer Eingriff), Radiotherapie oder Chemotherapie. Da sich viele Patienten erst mit Tumoren im Stadium T3/4 vorstellen (Vernham und Crowther 1994), wird meist mehr als eine Methodik angewandt. Zu beachten bei der Auswahl der Therapie ist unbedingt, dass die Behandlungen teilweise schwere und belastende Nebenwirkungen und Langzeitkomplikationen mit sich bringen. Dazu gehören zum Beispiel entstehende Gesichtsdeformitäten bei Operationen, erschwerte Mundöffnung, verminderte Zungenmobilität, in seltenen Fällen Sensibilitätsstörungen oder Xerostomie bei Strahlentherapie, letztere häufig von Patienten als eine der größten Belastungen empfundene Nebenwirkung (Kamstra et al. 2011). Es ist sinnvoll, die Behandlungsstrategie anhand der TNM-Stadien festzulegen, da es sich dabei um die einzig anerkannte Klassifikation von Tumoren handelt.

Eine Monotherapie kommt nur bei Tumoren im Stadium T1 und maximal T2 infrage (Lamarre et al. 2012).

Eine operative Entfernung kann prinzipiell in allen Tumorstadien erfolgen, sofern der Tumor operabel ist und keine anderen Kontraindikationen bestehen. Da in fortgeschrittenen Stadien eine Mandibulotomie und plastische Rekonstruktionen notwendig werden können, steigt das Eingriffsrisiko für den Patienten. Ein genaues Abwägen der Möglichkeiten ist indiziert. Eine alleinige Operation ohne adjuvante Therapien sollte lediglich bei Karzinomen im Stadium T1 oder maximal T2 und N0 angewandt werden. Für Patienten, die diese Kriterien erfüllen, können so die Nebenwirkungen der Radiotherapie vermieden werden (Cosmidis et al. 2004). Eine R0-Resektion muss hierbei unbedingt angestrebt werden. Parallel dazu findet eine Neck dissection statt, deren genaue Durchführung von Lokalisation des Primärtumors sowie Anzahl, Größe und Lage der befallenen Lymphknoten abhängt.

Eine operative Entfernung kann des Weiteren mit postoperativen adjuvanten Therapien kombiniert werden. Dazu gehören die Radiotherapie oder Radiochemotherapie. Dieser Therapieplan wird vor allem in fortgeschrittenen Stadien angewendet.

Auch die Radiotherapie kann alleinig, zum Beispiel bei Tumoren T1 und T2, durchgeführt werden. In diesen Stadien kann sie der alleinigen chirurgischen Behandlung sogar gleichwertig sein. (Mendenhall et al. 2006). In fortgeschrittenen Stadien kann sie in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt werden (Park et al. 2013).

Eine alleinige Chemotherapie wird bisher nur in der Palliativmedizin angewandt. Chemotherapeutika kommen sonst in Kombination mit anderen Therapiemöglichkeiten vor und spielen vor allem in der Behandlung von Tumoren im Spätstadium eine wichtige Rolle. Die hauptsächlich benutzten Substanzen sind 5-Floururacil in Kombination mit Cisplatin. Zunehmend spielt auch der monoklonale Antikörper gegen EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) eine wichtige Rolle.

In allen Stadien sollten eine supportive Therapie und angemessene Schmerzbehandlung sowie psychologische Betreuung angeboten werden.

1.2.6 Nachsorge

Zur Nachsorge können klinische Untersuchungen, bildgebende Verfahren in regelmäßigen Abständen sowie Laborkontrollen gehören. Einheitlichen Richtlinien existieren bislang nicht. Vielmehr ist das Verfahren von Klinik zu Klinik unterschiedlich. Auch innerhalb einer Klinik können Differenzen existieren, zum Beispiel wenn Patienten in Studien eingeschlossen werden.

Zur klinischen Untersuchung gehören Palpation, Inspektion und Laryngoskopie. Es muss auf Schleimhautödeme, Raumforderungen, Stimmlippenmotilität, Speichelseen (Hinweise für Dysphagie) und Leukoplakien geachtet werden. Außerdem kann eine Sonografie des Halses durchgeführt werden, um auffällige Lymphknoten frühzeitig zu detektieren. In regelmäßigen Abständen werden bildgebende Verfahren durchgeführt.

Die für die Laborkontrolle relevanten Werte können ein großes Blutbild, Gerinnung, Leberparameter, Laktatdehydrogenase, Elektrolyte, Kreatinin oder Harnstoff sein. Diese Werte sind eher geeignet, Metastasen zu erkennen. Molekulare Marker oder Laborwerte zur spezifischen Erkennung eines lokalen Tumorrezidivs existieren nicht.

Die Nachsorge sollte regelmäßig und lebenslang erfolgen.

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

In diesem Projekt soll sich der Zusammenhang zwischen HPV und Karzinogenese beim Tonsillenkarcinom sowie die spezifischen Eigenschaften dieser Virusinfektion zunutze gemacht werden.

Langfristiges Ziel ist es, eine Methodik zu entwickeln, die eine verbesserte Nachsorge von Patienten mit Tonsillenkarcinom ermöglicht. Für diese sind bisher keine molekularen Marker etabliert. Vielmehr kann ein Rezidiv erst dann entdeckt werden, wenn es sichtbar oder tastbar ist bzw. wenn Metastasen im Röntgenbild oder Lymphknotenveränderungen in der Sonografie sichtbar werden. Natürlich vermindert das die Überlebenschance und Lebensqualität des Patienten. Nach heutigem Stand ist die Prognose bei Rezidiv schlecht mit niedriger Lebenserwartung (Wong et al. 2003, Gibson et al. 2005). Molekulare Marker könnten eine frühzeitige Rezidiverkennung ermöglichen und weitere genaue Untersuchungen und Behandlungen veranlassen.

Die von uns vorgeschlagene Methodik wäre geeignet für eine bestimmte Subgruppe von Patienten: HPV-positiver Tumor und Integration des viralen Genoms in das zelluläre Genom. Von vorneherein kann also kein Benefit für alle Patienten erreicht werden. Die Zahl HPV-positiver Tumore ist allerdings schon heute hoch (Nasman et al. 2009). HPV gilt als Karzinogen der Oropharynxkarzinome, speziell für den Subtyp der Tonsillenkarcinome. In den letzten Jahren konnte des Weiteren ein Anstieg HPV-induzierter Karzinome beobachtet werden. Im Vergleich zu Tabak-assoziierten Tumoren nahmen diese zu und ein Fortsetzen dieses Trends ist zu erwarten (Chaturvedi et al. 2011). Eine Umorientierung in Behandlungs- und Nachsorgekonzept bei Patienten mit Tonsillenkarcinomen ist also durchaus gerechtfertigt.

Bei Zervixkarzinomen steigt die Wahrscheinlichkeit einer Integration des Virusgenoms bei Karzinomen im Vergleich zu Läsionen. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Stufe der Tumorgenese und Häufigkeit der Integrationen (Vinokurova et al. 2008). Es handelt sich bei der Integration also nicht um einen seltenen Prozess. Es ist anzunehmen, dass man diese Tatsache auf den Verlauf Karzinogenese beim Tonsillenkarcinom übertragen kann.

In laborinternen Vorversuchen wurde festgestellt, dass eine Integration des viralen in das zelluläre Genom auch in HPV-positiven Tonsillenkarcinomen vorkommt (40 %). Die Integrationsstellen waren tumorspezifisch, lediglich in einem spezifischen Tumor bei nur einem spezifischen Patienten zu finden und stellten somit eine Art molekularer Fingerabdruck dar (Schumann 2012). Deswegen kann die Sequenz des viral-zellulären

Überganges als molekularer Marker verwendet werden. Idealerweise kann man Tumorzellen mit diesen Markern nicht nur in der eigentlichen Biopsie nachweisen, sondern auch in Abstrichen desselben Patienten bei nur geringer Zellzahl. Die vorliegende Arbeit möchte sich mit dieser Frage auseinandersetzen. Nach der Etablierung molekularer Marker anhand der Tumorbiopsien einzelner Patienten sollen dazugehörige präoperative Abstriche untersucht werden.

Es handelt sich dabei um eine „Proof of principle“-Studie. Natürlich geht es langfristig gesehen darum, postoperative Abstriche auf Tumorzellen zu untersuchen. Diese wären dann ein Hinweis auf ein Rezidiv. Die Untersuchung der präoperativen Abstriche soll zeigen, dass die Methodik sensitiv und spezifisch genug ist und deswegen prinzipiell auch für die Nachsorge geeignet ist. Sind Tumorzellen in präoperativen Abstrichen nachweisbar, so sollten – im Falle eines Rezidives – auch im postoperativen Abstrich Tumorzellen zu finden sein. Wird diese Theorie bestätigt, so könnte man später die molekularen Marker aus Tumorbiopsien gewinnen und dann im Rahmen der Nachsorge regelmäßig an Abstrichmaterial testen.

Dies soll den Hauptteil der Arbeit ausmachen. Nebenbei werden die Krankheitsverläufe und Nachsorge der Patienten weiter verfolgt und postoperative Abstriche entnommen. Diese werden dann im Labor untersucht.

Das Ziel ist, damit einen Beitrag zur Verbesserung der Nachsorge, des Überlebenszeitraums sowie der Lebensqualität zu leisten.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Aqua dest (RNA- und DNA- frei)	Gibco
Agarose	Biozym
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Borsäure.....	Carl Roth
Bromphenolblau	Merck
50 x Denhardt	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO).....	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrophosphat (Na_2HPO_4)	Roche
DNA-Leiter 1 kb.....	Fermentas
DNA-Leiter 10 bp.....	Fermentas
dNTPs	Roche
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco
Entwicklerlösung	ADEFO-CHEMIE GmbH
Ethanol 96 %ig	Baker
Ethidiumbromid.....	Carl Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,5 M	Merck
fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Ficoll-Lösung	Amersham Bioscience
Fixationslösung.....	ADEFO-CHEMIE GmbH
[gamma-32P] ATP.....	Hartmann Analytic
Glycerol	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumcitrat (Na-Citrat).....	Carl Roth
Natriumdihydrophosphat (NaH_2PO_4)	Roche
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
1 x PBS	Gibco
Penicillin/Streptomycin-Lösung.....	Gibco
PreservCyt® Solution.....	Thinprep®
RA-1	Macherey-Nagel
RNA Later	Qiagen
RNase Out Ribonuklease Inhibitor.....	Invitrogen

Sodium Dodecyl Sulfat (SDS).....	Carl Roth
SybrGreen 10000x.....	Invitrogen
Tris.....	Carl Roth
Trypsin 0,05 %.....	Gibco
Xylencyanol.....	Merck
Yeast t-RNA	Roche

2.2 Puffer und Lösungen

5 x Blotpuffer	200 g NaOH 438 g NaCl ad 2,5 l ddH ₂ O
70 % Ethanol	36,5 ml Ethanol 96 % 13,5 ml ddH ₂ O
Einfriermedium	30 ml DMEM 15 ml FCS 5 ml DMSO
6 x Gelladepuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerol
Kulturmedium Zellkultur	500 ml DMEM 10 % FCS (50 ml) 1 % Penicillin/Streptomycin (5 ml)
Lysepuffer	7 ml RA-1 70 µl beta-Mercaptoethanol
1 M NaPP	73,5 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 26,5 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ für pH 6,4

20 x SSC	348 g NaCl 176 g Na-Citrat ad 2 l ddH ₂ O
20 x TBE-Puffer	216 g Tris 0,9 M 110 g Borsäure 0,9 M 80 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) ad 1 l ddH ₂ O
Trypsin-EDTA	1 l x PBS 0,5 g Trypsin 0,05 % 4 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)

2.3 Kits/Enzyme

Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox).....	Roche
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena
NucleoSpin® RNAII	Macherey-Nagel
Polynukleotid Kinase.....	Roche
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase.....	Invitrogen
Transcriptor One-Step RT-PCR Kit	Roche
Venor GeM Mykoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs

2.4 Oligonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Oligonukleotide) sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	T _A	Verwendung
CDS	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T)30VN	50 °C	Reverse Transkription
CDS-R1	AAG CAG TGG TAA CAA CGC A	61 °C	Reverse-Primer APOT 1.PCR

CDS-R2	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CT	66 °C	Reverse-Primer APOT 2.PCR
701for16	CGG ACA GAG CCC ATT ACA AT	61 °C	Forward-Primer
728for16	CCT TTT GTT GCA AGT GTG ACT CTA CG	66 °C	Forward-Primer APOT 2.PCR
β-Aktin-F	GCA GTG ATC TCC TTC TGC ATC	58 °C	Forward-Primer β-Aktin PCR
β-Aktin-R	GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG	58 °C	Reverse-Primer β-Aktin PCR
F102	AAT GTT TCA GGA CCC ACA GG	58 °C	Forward-Primer HPV16-PCR
E6*I	CTT TTG ACA GTT AAT ACA CCT CAC G	58 °C	Reverse-Primer HPV16-PCR
SiHa FT F1	CGA GAT GGA GAA GGT GAG GA	60 °C	Forward-Primer
SiHa FT R1	AAT TGT GTG CCC CAT CTG TT	60 °C	Reverse-Primer 1
SiHa FT R2	TAA TCT ACC ATG GCT GAT CCT G	60 °C	Reverse-Primer 2
HPV16validfor	AAT TGT GTG CCC CAT CTG TT	58 °C	Forward-Primer 1. TS-PCR
HPV16nestedfor	GTG CCC CAT CTG TTC TCA G	59 °C	Forward-Primer 2. TS-PCR
28R1	AGC CTC CTT CAG AAT GTT CG	58 °C	Reverse-Primer 1.PCR
28R2	GTG GTG GCA CCT CTA GAT CC	59 °C	Reverse-Primer 2.PCR
33R1neuA	CAC ATC TCA GGC CTT GAT GAA C	58 °C	Reverse-Primer 1.PCR
33R2	AGC CAT GCC TCT TAT GTG GA	59 °C	Reverse-Primer 2.PCR
SiHa S1	CAG ACA CAG TAG ACC TGC AGG ATC	58 °C	Sonde SiHa
28 S1	GGC TGA TCC TGC AGT TTT CTT	58 °C	Sonde Patient 28

33 S1	CTG ATC CTG CAG CAA ATG AA	58 °C	Sonde Patient 33
R226	CTC ACG TCG CAG TAA CTG TTG	56 °	Sonde HPV16

2.5 Geräte

Autoklav MMM GmbH
 Brutschrank BBD6220 Heraeus
 Eismaschine Nordcap
 Feinwaage Kern
 Flammy S Brenner Schütt-biotec
 Gefrierschrank (-80 °C) Ferma Scientific, Thermo Scientific
 Gefriertruhe (-20 °C) Liebherr
 Gelelektrophoresezubehör Biometra
 GS Gene Linker™ UV Chamber Bio-Rad
 Heizplatte IKA Labortechnik
 Homogenisator Model TH Omni International
 Hybaid TouchDown PCR-Gerät Pegasus Scientific Inc
 Hybridisierungsöfen UVP, Heraeus
 Kühlschrank (+4 °C) Liebherr
 Magnetrührgerät MR 3000D Heidolph
 Mastercycler Gradient Eppendorf
 Megafuge Heraeus
 Mikroskop Zeiss
 Mikrowelle Panasonic
 Nanodrop PeqLab
 Kontaminations-Monitor LB122 (β/γ-Strahlung) Berthold
 Pipetten Gilson, Eppendorf, Brand
 Rotorgene Q PCR-Gerät Qiagen
 Schüttler Heidolph
 Sterilwerkbank The Baker Company
 Thermomixer comfort Eppendorf
 Tischzentrifuge Eppendorf, Heraeus
 UV-Geldokumentation DarkHood DH 30/32 Biostep
 UV-Tisch Konrad Benda Wiesloch

Vacuum Blotter Model 785 Bio-Rad
 Vortexer Scientific Industries, Fisons
 Wasseraufbereitungsanlage Synergy UV (ddH₂O) Millipore

2.6 Verbrauchsgegenstände

Cryo.S PP Greiner Bio_one
 75 cm²-Zellkulturflaschen BD Falcon™
 8er-Streifen Tubes (0,2 ml)..... Biozym
 AbstrichbürstchenGynobrush® Spezial Heinz Herenz Hamburg-Germany
 Biopsieröhrchen Cryovial®..... Roth
 Cryoröhrchen S..... greiner bio-one
 Descosept AF Desinfektionsmittel Dr. Schumacher
 EDTA-Monovetten Sarstedt
 Gel Blot Paper Whatman
 Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)..... BD Falcon™
 Glaswaren Schott, FisherBrand
 Handschuhe
 LeucoSepröhrchen Greiner Labortechnik
 mini Quick Spin Columns Roche
 Nylonmembran positiv-geladen Roche
 Petrischalen..... BD Falcon™
 Röntgenfilm Kodak
 Tubes (0,2 ml – 2 ml)..... Sarstedt, Brand

2.7 Zelllinien

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	HPV-Status	Medium
SiHa	Zervixkarzinom	16, integriert	DMEM + 10% FCS + 1% P/S
CaSki	Zervixkarzinom	16, integriert	DMEM + 10% FCS + 1% P/S
C33A	Zervixkarzinom	negativ	DMEM + 10% FCS + 1% P/S

2.8 Patientenmaterial

Für dieses Projekt wurde Probenmaterial von Patienten mit Tonsillenkarcinom mit histologisch nachgewiesenem Plattenepithelkarzinom gesammelt. Von jedem Patienten wurde eine Tumorbiopsie und präoperative Abstriche, je vom Primärtumor selbst und aus dem Sulcus glossoalveolaris, abgenommen. Im Rahmen der postoperativen Nachsorge wurden postoperative Abstriche jeweils vom Sulcus glossoalveolaris und Exzisionsgebiet sowie EDTA-Blut gesammelt.

An diesem Projekt nahmen sechs Zentren teil, die Proben bereitstellten: die jeweiligen HNO-Kliniken vom Universitätsklinikum Jena (Prof. Dr. med. Guntinas-Lichius), Heliosklinikum Erfurt (Prof. Dr. med. Eßer), SRH Waldklinikum Gera (Prof. Dr. med. Müller), Universitätsklinikum Gießen (Prof. Dr. med. Klußmann), Universitätsklinikum Essen (Prof. Dr. med. Hoffmann) und Klinikum Bielefeld Mitte (Prof. Dr. med. Sudhoff). Das Vorgehen wurde von der Ethik-Kommission des Universitätsklinikum Jena genehmigt.

Insgesamt wurde Patientenmaterial von 42 Patienten in dieser „Proof of principle“-Studie im Zeitraum vom Oktober 2010 bis August 2011 gesammelt und verwendet. Die Patientenproben wurden in Reihenfolge des Laboreinganges mit den Nummern 1 bis 42 nummeriert. Außerdem erfolgte eine zusätzliche Bezeichnung mit Buchstaben zur Unterscheidung der Proben (a – Abstrich Sulcus präoperativ, b – Abstrich Primärtumor präoperativ, c – Abstrich Sulcus postoperativ, d – Abstrich Exzisionsstelle postoperativ). Weitere Versuche mit den Patientenproben und Kommunikation über die Ergebnisse konnten so pseudonymisiert erfolgen.

Der Medianwert des Alters lag bei 59,5 Jahren, der Mittelwert bei 61,07 Jahren. 32 Patienten waren männlich, 7 weiblich, bei 3 Patienten wurde uns das Geschlecht nicht mitgeteilt.

3. Methoden

3.1 Grundlegende Methoden im Umgang mit den Proben

3.1.1 Umgang mit dem Probenmaterial

In diesem Projekt wurde mit RNA gearbeitet. Die ubiquitär vorkommenden RNasen stellen ein Problem dar. Sie sind sehr stabil und brauchen, anders als DNasen, keine Cofaktoren wie zum Beispiel Mg^{2+} um aktiv zu sein. Eine Kontamination damit ist deshalb zu vermeiden. Dementsprechend ist RNA ein eher instabiles Molekül und die Lagerung fand bei $-80^{\circ}C$ statt.

Die häufig angewendete Methodik der PCR ist hochsensitiv und kann kleinste Mengen an genetischem Material nachweisen. Es besteht immer die Gefahr einer Kontamination. Um diesen vorzubeugen, wurde die Probenaufbereitung in einem gesonderten Laborraum durchgeführt. Bei Durchführung der Arbeiten wurden Einweghandschuhe getragen und die Arbeitsfläche vor und nach dem Arbeiten mit Reinigungslösungen dekontaminiert. Auch sonstige verwendete Materialien wie Tubes oder Pipettenspitzen mussten RNase- und DNase-frei sein.

3.1.2 Probenaufbereitung

3.1.2.1 Tumorbiopsie

Die Entnahme der Tumorbiopsie fand in der Klinik statt. Die Lieferung erfolgte auf schnellstmöglichen Weg gekühlt, aber nicht gefroren an das Labor. Zur Stabilisierung der RNA lagerten die Proben in 2 ml RNALater (Firma Qiagen). In diesem Zustand konnten diese bis zu vier Wochen bei $4^{\circ}C$ stabil aufbewahrt werden. Gewebeschnitte der Biopsien für mikroskopische Verfahren waren durch den RNALater nicht mehr möglich. Im Folgenden wurde die Probe in $700\ \mu l$ Lysepuffer überführt und anschließend homogenisiert. Die Probe konnte dann bei $-80^{\circ}C$ stabil über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

3.1.2.2 Abstriche

Die Abstriche wurden mit Bürstchen in der Klinik entnommen und gekühlt an das Labor verschickt. Die Lagerung erfolgte in Falcon-Röhrchen, die mit je 4 ml Thinprep® PreservCyt-Lösung gefüllt waren. Zur Lösung des Zellmaterials von den Bürstchen wurden die Probenröhrchen im Labor 2 Minuten mit dem Vortexer heftig gemischt und abgeflammt. Benutzte Pinzetten wurden mit 80 %igem Ethanol und Abflammen

dekontaminiert. Nach Entfernung der Bürstchen aus dem Röhrchen mit Hilfe von Pinzetten wurden 2 ml der Probe in ein Tube gegeben. Durch eine Zentrifugation bei 1400 rpm entstand ein Pellet am Gefäßboden, in dem sich die Zellen befinden. Der Überstand wurde mit der Pipette entfernt, die restlichen 2 ml aus dem Falcon-Röhrchen hinzugegeben und die Schritte der Zentrifugation und Entfernung des Überstands wiederholt. Das Lösen des Zellpellets erfolgte in 350 µl Lysepuffer. In dieser Form konnte die Probe stabil bei -80 °C gelagert werden.

3.1.2.3 Blutproben

Es wurde nach einem durch Vorarbeiten im Labor etablierten Protokoll gearbeitet (Pfitzner et al. 2014) gearbeitet. Dieses ermöglichte die Isolierung und Extraktion von kernhaltigen Zellen aus Blut. Im Rahmen der postoperativen Nachsorge wurde den Patienten 8 ml EDTA-Blut entnommen und bei Raumtemperatur an das Labor geschickt. Ein erster Schritt umfasste die Zentrifugation von je 3 ml Ficolllösung in 4 LeukoSep-Röhrchen bei 2200 rpm für 30 Sekunden. Nach Verteilung von jeweils 2 ml des Blutes auf diese 4 Röhrchen fand eine erneute Zentrifugation bei 2200 rpm für 15 Minuten bei 20 °C statt. Das dadurch entstandene Plasma wurde mit einer Pipette vorsichtig entfernt und das restliche Volumen über der Trennscheibe des LeukoSep-Röhrchens in ein 4,5 ml Röhrchen mit konischem Boden überführt. Es erfolgte eine Aufteilung von je 2 LeukoSep-Röhrchen in ein 4,5 ml Röhrchen. Nach Hinzufügen von 1 ml 1 x PBS wurde dieses Röhrchen zweimal geschwenkt und dann erneut zentrifugiert (900 rpm für 10 Minuten ohne Bremse bei 4 °C). Der Überstand konnte danach entfernt und das Pellet in je 750 µl resuspendiert werden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.3 RNA-Extraktion

Die Proben waren durch die Lagerung im Lysepuffer aufgeschlossen und konnten weiter bearbeitet werden. Die RNA-Extraktion erfolgte für Tumorbiopsie, Abstriche und Blut mit einem kommerziellen Kit (NucleoSpin RNAII®, Macherey-Nagel). Die RNA-Extraktion wurde wie im Protokoll des Kits beschrieben durchgeführt. Abgeändert wurde lediglich der Schritt der Elution: Abstrichmaterial wurde in 20 µl, Tumormaterial in 40 µl ddH₂O und Blutprobe in 20 µl eluiert. Grund hierfür lag im Unterschied der erwartete Menge an RNA in den Proben – bei Tumorbiopsien war die Ausbeute in der Regel recht hoch, bei Abstrichen und Blut etwas geringer. Aus Tumorbiopsien extrahierte RNA wurde anschließend am Nanodrop-Gerät vermessen.

Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C um Stabilität auf längere Zeit zu garantieren.

3.2 Zellkulturarbeiten

Für diese Arbeiten wurden die Zelllinien SiHa, CaSki und C33A kultiviert. Sie sind im Hinblick auf HPV 16 genau charakterisiert und können daher als Modell und Kontrolle für die später verwendeten Tumorbiopsien und Abstriche verwendet werden. SiHa und CaSki sind HPV 16-positive Zervixkarzinomzelllinien und weisen integrierte HPV-DNA auf. Die Sequenzen der viral-zellulären Fusionstranskripte sind bekannt. Auch C33A ist die Zelllinie eines Zervixkarzinoms. Sie ist allerdings HPV-negativ und eignet sich daher in dem Kontext des Projekts als Modell für eine unauffällige, nicht betroffene Zelle. Bei allen drei Zelllinien handelt es sich um adhärente Zellen.

Alle Arbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Verwendete Materialien und Gegenstände mussten vor Benutzung mit Desinfektionsmittel abgesprüht und abgeflammt werden. Die Kultivierung der Zelllinien fand in 75 cm²-Kulturflaschen statt. Als Medium wurde mit 10% FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetztes DMEM verwendet. Regelmäßig wurden die Zelllinie deswegen mit dem Mikroskop auf Zelldichte und Anzahl toter Zellen untersucht. Ein Mediumwechsel fand mindestens alle 3 Tage statt.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5,0 % CO₂ aufbewahrt.

3.2.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei -180 °C in Stickstoff gelagert und mussten für die Kultivierung aufgetaut werden. Dieser Prozess fand im Wasserbad bei 37 °C statt. Da das Einfriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO) zelltoxisch wirkt, muss dieser Vorgang schnell erfolgen. Die Zellen kamen danach in ein mit Medium gefülltes 15 ml Falcon-Röhrchen und wurden 4 – 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in Medium resuspendiert und anschließend zusammen mit 15 ml Medium in die Kulturflasche gegeben.

3.2.2 Zellsplitting

War der Nährboden sehr dicht mit Zellen bewachsen, musste ein Zellsplitting durchgeführt werden. Dabei wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Flasche mit etwa 4 – 5 ml Trypsin/EDTA gespült. Danach erfolgte die Lösung der Zellen vom Flaschenboden durch Zugabe von 1,5 ml erwärmtem Trypsin/EDTA in die Flasche für 3 – 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C. Nach Resuspension der gelösten Zellen mit 8 ml Medium wurde ein Teil dieser, abhängig von der Dichte vor dem Splitting, wieder in die Kulturflasche gegeben. Danach wurden 15 ml Medium hinzugegeben.

3.2.3 Mykoplasmentest

Dieser Test hilft, die Zellkultur hinsichtlich Bewachung durch Mykoplasmen zu überprüfen. Es wurde ein kommerzielles Kit verwendet (Venor GeM Mykoplasma Detection Kit von Minerva Biolabs) und der Versuch nach beiliegendem Protokoll durchgeführt.

3.2.4 Zellernte

In diesem Schritt wurden die Zellen zuerst trypsinisiert und anschließend in Medium resuspendiert, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und 4–5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt worden ist, wurden 8–10 ml PBS-Puffer in das Röhrchen gegeben und es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 Minuten; 1100 rpm). Nach einer erneuten Entfernung des Überstandes konnten 700 µl Lysepuffer zugegeben und das Zellmaterial stabil bei -80 °C gelagert werden.

Aus dem Material konnte später die RNA für die Vorversuche extrahiert werden (siehe Kapitel 3.1.3).

3.2.5 Einfrieren der Zellen

Nachdem die Zellen 4 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert wurden und der Überstand entfernt worden ist, musste das entstandene Pellet in 2 ml Einfriermedium resuspendiert werden. In diesem Fall wurde die Suspension auf 2 Cryoröhrchen verteilt, zwei Tage bei -80 °C gelagert und dann für die dauerhafte Aufbewahrung in Stickstoff (-180 °C) überführt.

3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.3.1 Grundlegendes Prinzip der PCR

Im Verlauf dieser Arbeit wurde häufig mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) gearbeitet. Hierbei handelt es sich um eine hochsensitive Methode, die Fragmente von genetischem Material mithilfe von bakteriellen, thermostabilen DNA-Polymerasen vervielfältigen kann. Aufgrund dieser Sensitivität besteht die Gefahr der Kontamination, die unbedingt zu vermeiden ist. Deswegen mussten die Vorarbeiten in einem gesonderten Raum durchgeführt, Flächen vor Benutzung desinfiziert und beim Arbeiten immer Handschuhe getragen werden. Für das Pipettieren wurden gesonderte Pipetten verwendet, die nur zur Herstellung von PCR-Ansätzen und nicht für Proben verwendet wurden.

Bei jeder PCR kommt es durch eine spezifische Temperaturabfolge zur Amplifikation der DNA. Das Temperaturprofil wird dem jeweiligen Zweck der PCR angepasst.

Typischerweise beinhaltet jede PCR die drei zyklisch auftretenden Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation. Während der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) in einzelsträngige DNA (ssDNA) aufgespalten. Die Temperatur für diesen Schritt beträgt normalerweise 94 °C. In der darauffolgenden Phase, der Annealingphase, binden die Primer an die DNA-Fragmente. Die Temperatur dieser Phase (T_A) ist abhängig vom Primer und muss individuell gewählt werden. In der zum Schluss stattfindenden Elongationsphase findet die Synthese des komplementären DNA-Stranges statt. Abhängig von der in der PCR verwendeten Polymerase beträgt die Temperatur hierbei 68 °C oder 72 °C. Dieser Zyklus wiederholt sich meist 30 – 60 Mal.

Zur Kontrolle müssen in jedem PCR-Lauf mindestens eine negative Kontrollprobe (ddH₂O als Non Template Control/NTC) und mindestens eine positive Kontrollprobe mitgeführt werden. So ist eine interne Kontrolle der PCR-Methode gewährleistet und eine objektive Auswertung möglich.

3.3.2 Primerdesign

Beim Entwerfen von Primern müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt und beachtet werden. Sie sollten zum einen möglichst spezifisch sein und nicht an anderen Stellen des eingesetzten Templates binden können.

Bindungen der Primer untereinander sollten vermieden werden. Binden Primer eines PCR-Laufes aneinander, so können sogenannte Primer-Dimere entstehen. Diese können mit der Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.3) sichtbar gemacht werden. Primerdimere stellen eine Konkurrenzreaktion zur eigentlichen PCR dar und verringern damit die PCR Effizienz.

Das Design der Primer wird in der Regel so ausgerichtet, dass die T_A zwischen 55 °C und 65 °C beträgt. Wichtig ist, dass die T_A zweier Primer, welche in einem PCR-Lauf eingesetzt werden, möglichst gleich sind.

Das Design der Primer geschah mit dem Programm PearlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>). Dieses half, mögliche Bindungsstellen innerhalb der Primer oder mit anderen Primern zu finden sowie die spätere Annealingtemperatur abzuschätzen.

Auf das Primerdesign im Hinblick auf Tumore mit viral-zellulären Fusionstranskripten wird im Punkt 3.5.2 eingegangen.

3.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist geeignet um PCR-Produkte und DNA sichtbar zu machen und gleichzeitig hinsichtlich ihrer Größe aufzutrennen. Es wird sich die Eigenschaft negativer Ladung der DNA zunutze gemacht. Aufgrund dessen ist sie in der Lage, in einem elektrischen Feld zu wandern, sofern das Medium dafür gegeben ist. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in Richtung der positiv geladenen Anode. Dies geschieht in einem mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel, in dem kleinere Produkte schneller wandern als größere. Ethidiumbromid ist ein Stoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Bei dieser sogenannten Interkalation ändern sich seine Eigenschaften und es kommt zur Fluoreszenz. Hergestellt wird das Gel aus TBE-Puffer (150 ml bzw. 80 ml abhängig von der Größe des Gels) und Agarose. Die Agarose-Konzentration richtet sich nach der erwarteten Produktgröße. Die Menge an Ethidiumbromid richtet sich nach der Menge des TBE-Puffers: 7,5 µl auf 150 ml bzw. 4 µl auf 80 ml Pufferlösung.

Während dieser Arbeit wurde prinzipiell mit einer Gelkonzentration von 1,5 % gearbeitet, weil die Produktgröße in der APOT-PCR, dem Hauptversuch dieser Arbeit, vorher nicht bekannt war. Es wurden Produkte von 200 bp bis 1500 bp erwartet. Ausnahme waren Produkte aus PCRs, bei denen von vorne herein Produkte mit einer Länge weniger als 200 bp erwartet wurden. Hier wurde ein 2,0 %iges Gel verwendet.

Die PCR-Produkte und DNA werden mit 6 x Gelladepuffer versetzt (5 µl auf 25 µl Probe), zusammen mit einem DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen und an circa 120 V angeschlossen. Nach etwa 1 ½ Stunden kann das Gel unter UV-Licht betrachtet werden. Wichtig ist, je nach Produktgröße, eine gute Auftrennung der Proben.

3.3.4 Semi-nested und nested PCR

Bei einer semi-nested oder nested PCR handelt es sich um eine PCR, welche aus mindestens zwei Läufen besteht. In den aufeinander folgenden Läufen werden unterschiedliche Primer eingesetzt. Diese werden so gestaltet, dass die Primer des 2. Laufes innerhalb des Produktes des 1. PCR-Laufes liegen.

Von einer nested-PCR spricht man, wenn forward- und reverse-Primer der 2. PCR sich von denen der 1. PCR unterscheiden. Bei einer semi-nested-PCR wird nur ein Primer durch einen Neuen in der 2. PCR ersetzt. Sinn dieser Art von PCR ist eine erhöhte Sensitivität sowie Spezifität.

Auch bei der APOT-PCR handelt es sich um eine nested-PCR. Auf Grund der Bedeutung für diese Arbeit wird sie separat im Punkt 3.3.5 besprochen.

Es ist möglich RNA statt DNA als Template dieser PCR einzusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die reverse Transkription der RNA zu cDNA sowie der erste Lauf der semi-nested PCR (3.3.4.1 und 3.3.4.2) in einen Schritt („one-step“) vollzogen. Diese PCR nennt man one-step-PCR. Der Schritt der reversen Transkription findet initial des ersten PCR-Laufes statt (30 Minuten, 50°C). Für den Reaktionsansatz der one-step-PCRs wurde in dieser Arbeit durchgehend das Transcriptor One-Step RT-PCR Kit (Roche) mit Enzymmix und Reaktionspuffer verwendet.

3.3.4.1 Sensitivitätsnachweis mittels semi-nested PCR im Rahmen der Vorarbeiten

Mit SiHa-RNA wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Die höchste an RNA eingesetzte Menge betrug 160 pg (~ 8 Zellen), die direkt aus dem Originalstock RNA hergestellt wurde. Die Herstellung der weiteren Verdünnungen erfolgte im Verhältnis 1:2 aus der nächsthöheren Konzentration (also 80 pg aus 160 pg, 40 pg aus 80 pg usw.). Die größten Verdünnungen waren im Femtogrammbereich (156,25 fg), um sicher die Nachweisgrenze einzuschließen. Die einzelnen Verdünnungsstufen mit dem jeweiligen Äquivalent an Zellen sind in Tabelle 3 dargestellt. Für diesen Versuch wurde das Äquivalent einer Zelle als 20 pg festgelegt (Lehrbuch 10-30 pg). Als Negativ-Kontrollen wurden in beiden Versuchen CaSki in hoher Konzentration (10 ng) und ddH₂O (NTC) mitgeführt.

C33A-RNA wurde in jeder Stufe der Reihe im Hintergrund mitgeführt (100 ng ~ 5000 Zellen). Sie war ein Modell für die in vivo vorkommende unauffällige Körperzellen.

Tabelle 3: Stufen der Verdünnung von SiHa-RNA

RNA	160 pg	80 pg	40 pg	20 pg	10 pg	5 pg
Zellen	8	4	2	1	0,5	0,25

RNA	2,5 pg	1,25 pg	0,625 pg	312,5 fg	156,25 fg
Zellen	0,125	~ 0	~ 0	~ 0	~ 0

Da RNA als Template eingesetzt wird, handelt es sich um eine one-step-PCR. Durchgeführt wurde die PCR im RotorGene von Qiagen. Die Primerwahl dieser semi-nested-PCR wird in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Verwendete Primer für die semi-nested-PCR mit SiHa-Verdünnungsreihe

Forward-Primer	Erst- und Zweit-PCR	SiHa FT F1
Reverse-Primer	Erst-PCR	SiHa FT R1
	Zweit-PCR	SiHa FT R2

Reaktionsansatz:

Erst-PCR	5 x Reaktionspuffer	5 µl
	Enzymmix (Roche)	0,5 µl
	10 x SybrGreen	0,5 µl
	ddH ₂ O	6 µl
	Forward-Primer (10 pmol)	1 µl
	Reverse-Primer (10 pmol)	1 µl
	C33A 10 ng/µl	10 µl
	Template (RNA)	1 µl
		Σ 25 µl

Zweit-PCR	Fast Start Universal	
	SYBR Green Master (Rox)	12,5 µl
	Forward-Primer (10 pmol)	1 µl
	Reverse-Primer (10 pmol)	1 µl
	ddH ₂ O	9,5 µl
	Template (Produkt aus 1. PCR)	1 µl
		Σ 25 µl

PCR-Programm:	Erst-PCR		Zweit-PCR	
	30 min	50 °C	10min	94 °C
	5 min	94 °C	15sec	94 °C
	15 sec	94 °C	20sec	60 °C
	20 sec	60 °C	40sec	68 °C
	40 sec	68 °C	Schmelzkurve	
	Schmelzkurve			

} 30 x
 } 30 x

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 %iges Gel aufgetragen, daraufhin geblottet (Southern Blot, siehe 3.4) und mit Oligosonden hybridisiert. Die verwendete Sonde war S SiHa S1.

3.3.4.2 Tumorspezifische PCR (TS-PCR) an RNA

Hierbei handelt es sich um eine nested-one-step-PCR. Die Durchführung der Erst-PCR erfolgt im Rotorgene (Qiagen®), der Zweit-PCR im Eppendorf-Cycler.

Reaktionsansatz:

Erst-PCR	5 x Reaktionspuffer	5 µl
	Enzymmix (Roche)	0,5 µl
	10 x SybrGreen	0,5 µl
	ddH ₂ O	13 µl
	Forward-Primer (10 pmol)	1 µl
	Reverse-Primer (10 pmol)	1 µl
	Template (RNA)	4 µl
		Σ 25 µl
Zweit-PCR	UDG-Mix (Invitrogen)	12,5 µl
	Forward-Primer (10 pmol)	1 µl
	Reverse-Primer (10 pmol)	1 µl
	ddH ₂ O	9,5 µl
	Template (Produkt aus 1. PCR)	1 µl
		Σ 25 µl

Das in der Zweit-PCR eingesetzte Template aus der Erst-PCR wurde vor Verwendung im Verhältnis 1:3 mit ddH₂O verdünnt.

PCR-Programm:	Erst-PCR		Zweit-PCR	
	30 min	50 °C	10 min	94 °C
	5 min	94 °C	15 sec	94 °C
	15 sec	94 °C	20 sec	X °C
	20 sec	X °C	40 sec	68 °C
	40 sec	68 °C	Schmelzkurve	
	Schmelzkurve			

Die Annealingtemperatur X war abhängig von den jeweiligen tumorspezifischen Primern und mussten individuell gewählt werden (siehe 2.4).

3.3.4.3 Tumorspezifische PCR an cDNA

Tumorspezifische Primer können natürlich auch an cDNA statt RNA in einer Endpunkt-PCR durchgeführt werden.

Reaktionsansatz	Fast Start Universal	
	SYBR Green Master (Rox)	12,5 µl
	Forward-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
	Reverse-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
	ddH ₂ O	9,5 µl
		Σ 25 µl
PCR-Programm:	10 Minuten	94 °C
	15 Sekunden	94 °C
	20 Sekunden	61 °C
	40 Sekunden	68 °C
	Schmelzkurve	

} 45 x

3.3.5 APOT-PCR

Die APOT-PCR (Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcript) ist ein 3' RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA ends with PCR), die es ermöglicht, Transkripte mit HPV-Anteil und unbekanntem 3'Ende zu amplifizieren, in diesem Projekt speziell HPV 16. Die Methodik wurde 1999 von Klaes et al etabliert (Klaes et al. 1999) um den HPV-Status in Zervixkarzinomen zu bestimmen, also die Unterscheidung zwischen episomal abgeleiteten Transkript und viral-zellulären Fusionstranskript (Abb. 5).

Episomal abgeleitete Transkripte und viral-zelluläre Fusionstranskripte sind in der Regel unterschiedlich in der Basenanzahl. Eine unwahrscheinliche Ausnahme ist hierbei ein viral-zelluläres Fusionstranskript, welches zufällig die Länge von 1050 bp aufweist. Normalerweise weisen deswegen Gelbilder Banden auf unterschiedlicher Höhe auf. In beiden Fällen besitzen die Transkripte aber eine poly(A)-Sequenz am 3'-Ende sowie, sofern HPV-positiv, eine virale Sequenz.

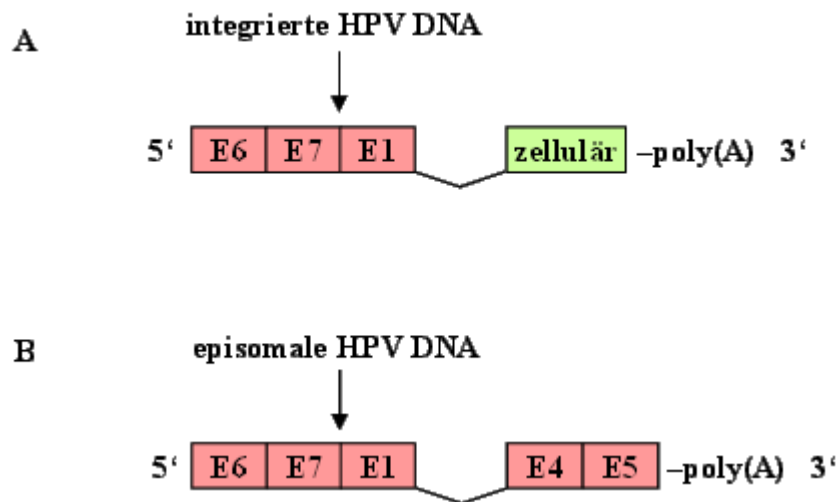


Abb. 5: Struktur der Transkripte bei episomal abgeleiteten Transkript (B) und der häufigsten Form des viral-zellulären Fusionstranskriptes (A)

3.3.6.1 Reverse Transkription

In einem ersten Schritt wird die aus der Tumorbiopsie gewonnene RNA zu cDNA umgeschrieben. Die eingesetzte Menge an Template beträgt 500 ng.

Bis auf den Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende ist die Sequenz der Transkripte unbekannt. Deswegen wird ein oligo (dT)-Primer mit einer bekannten Ankersequenz am 5'-Ende eingesetzt. Es entsteht cDNA als Produkt, die die Sequenz des Transkripts, eine poly(T)-Sequenz und die Ankersequenz aufweist (Abb. 6).

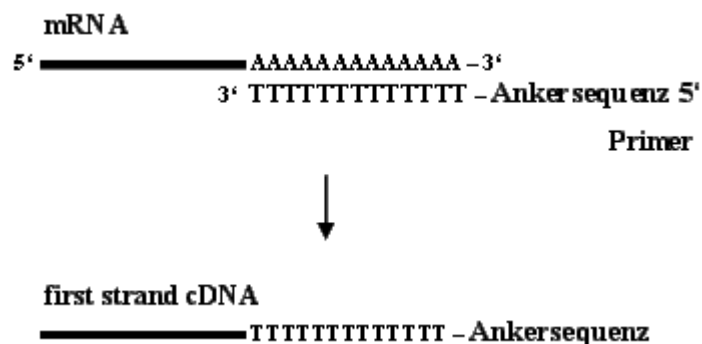


Abb. 6: cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Der Ablauf der Reversen Transkription ist wie folgt:

CDS-Primer (10 pmol/μl)	1 μl
dNTP (10 mM/each)	1 μl
Template RNA (500 ng)	11,5 μl

Dieser Ansatz muss für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt und danach mit Eiswasser abgekühlt werden. Parallel wird ein zweiter Mix separat angefertigt:

5 x first strand buffer	4 μl	
DTT (0,1 M)	1 μl	
RNase out (40 units/μl)	0,5 μl	Inkubation 5 Minuten bei 50 °C
SuperscriptIII (200 units)	1 μl	

Beide Ansätze werden zusammengefügt. Das Programm im Gerät Hybaid TouchDown PCR-Gerät (Pegasus Scientific Inc.) war wie folgt:

60 Minuten	50 °C
15 Minuten	70 °C
forever	4 °C

Die cDNA konnte für weitere Verwendung bei -20 °C über längere Zeit stabil gelagert werden.

3.3.6.2 Nested-PCR

Bis auf andere Primer wurde sich an das Protokoll wie in der Literatur beschrieben gehalten (Klaes et al. 1999). Es handelt sich bei dieser PCR um eine nested-PCR.



Abb. 7: Primer-Lokalisation für die APOT-PCR (F1+2: Forward-Primer, R1+2: Reverse-Primer)

Die Forward-Primer liegen auf dem HPV 16-Genom (E7-Bereich). Nur Transkripte, die HPV 16 aufweisen, sind damit amplifizierbar. Die Reverse-Primer liegen im Bereich der bekannten Ankersequenz der cDNA (Abb. 7).

Für die PCR wurde die Taq-DNA-Polymerase von der Firma Invitrogen verwendet. In der Erst-PCR wurde cDNA eingesetzt, in der Zweit-PCR das PCR Produkt der ersten PCR, wobei sich der jeweilige Reaktionsansatz glich. Das PCR-Programm unterschied sich nur durch die Annealingtemperatur, da unterschiedliche Primer eingesetzt wurden (Tabelle 5). Die PCR wurde im Eppendorf-Cycler durchgeführt.

Tabelle 5: Primer und Annealing-Temperatur der APOT-PCR

	Forward-Primer	Reverse-Primer	T_A
Erst-PCR	701for16	CDS-R1	61 °C
Zweit-PCR	728for16	CDS-R2	66 °C

Reaktionsansatz:	ddH ₂ O	18,6 µl
	10 x PCR-Puffer	2,5 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
	dNTP (10 mM/each)	0,5 µl
	Forward-Primer 25 pmol	0,25 µl
	Reverse-Primer 25 pmol	0,25 µl
	Taq-DNA-Polymerase	0,15 µl
	Template	2 µl
		Σ 25 µl

PCR-Programm:	3 Minuten	94 °C	
	30 Sekunden	94 °C	
	30 Sekunden	61 °C bzw. 66 °C	} 30 x
	4 Minuten	72 °C	
	6 Minuten	72 °C	
	forever	4 °C	

3.3.6.3 Ergebnis im Gelelektrophoresebild

Das Ergebnis der APOT-PCR kann man im Bild der Gelelektrophorese anhand der Bandengröße ablesen. Banden der Größe 1 kb sind ein starkes Indiz dafür, dass in der

Probe ein episomal abgeleitetes Transkript vorliegt. Werden Banden andere Größe sichtbar, so weist die Probe potentiell ein Fusionstranskript auf. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass eine Bande bei 1 kb ein Fusionstranskript nicht ausschließt.

3.3.6 β -Aktin PCR

Hierbei handelt es sich um eine Kontroll-PCR durch Nachweis des Housekeeping-Gens β -Aktin. Sie kann sowohl mit RNA als one-step-PCR sowie mit cDNA durchgeführt werden. Die PCR wurde im Rotorgene (Qiagen®) durchgeführt.

Reaktionsansatz mit cDNA

Reaktionsansatz:	Fast Start Universal	
	SYBR Green Master (Rox)	12,5 μ l
	β -Aktin-F-Primer (10 pmol)	1 μ l
	β -Aktin-R-Primer (10 pmol)	1 μ l
	ddH ₂ O	9,5 μ l
	Template (cDNA)	1 μ l
		25 μ l
PCR-Programm:	10 Minuten	94 °C
	20 Sekunden	94 °C
	15 Sekunden	58 °C
	30 Sekunden	72 °C
	Schmelzkurve	

} 40 x

Reaktionsansatz mit RNA

Reaktionsansatz:	5 x Reaktionspuffer	5 μ l
	Enzymmix (Roche)	0,5 μ l
	10 x Sybrgreen	0,5 μ l
	β -Aktin F (10 pmol/ μ l)	1 μ l
	β -Aktin R (10 pmol/ μ l)	1 μ l
	ddH ₂ O	12,5 μ l
	Template (RNA)	4,5 μ l
		Σ 25 μ l

PCR-Programm:	30 Minuten	50 °C	
	5 Minuten	94 °C	
	15 Sekunden	94 °C	} 30 x bzw. 45 x
	20 Sekunden	58 °C	
	40 Sekunden	68 °C	
	Schmelzkurve		

3.3.7 HPV 16-PCR

Auch bei dieser PCR handelt es sich um eine Kontroll-PCR, die spezifisch HPV Typ 16 nachweist. Es kann sowohl mit RNA (one-step-PCR im Rotorgen (Qiagen®)) als auch mit cDNA (durchgeführt im Eppendorf-Cycler) gearbeitet werden.

Reaktionsansatz mit cDNA

Reaktionsansatz:	ddH ₂ O	18,6 µl
	10 xPCR-Puffer	2,5 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
	dNTPs (10 mM/each)	0,5 µl
	HPV16-F102 (25 µmol/µl)	0,25 µl
	HPV16-E6*1 (25 µmol/µl)	0,25 µl
	Taq-DNA-Polymerase	0,15 µl
	Template (cDNA)	2 µl
		Σ 25 µl

PCR-Programm:	3 Minuten	95 °C	
	20 Sekunden	95 °C	} 40 x
	15 Sekunden	58 °C	
	30 Sekunden	72 °C	
	5 Minuten	72 °C	
	forever	4 °C	

Reaktionsansatz mit RNA

Reaktionsansatz:	5 x Reaktionspuffer	5 µl
	Enzymmix (Roche)	0,5 µl
	10 x Sybrgreen	0,5 µl
	RNase out	0,2 µl
	HPV16-F102 (10 pmol/µl)	1 µl
	HPV16-E6*I (10 pmol/µl)	1 µl
	ddH ₂ O	12,3 µl
	Template (RNA)	4,5 µl
		Σ 25 µl

PCR-Programm:	30 Minuten	50 °C	
	5 Minuten	94 °C	
	15 Sekunden	94 °C	} 30x
	20 Sekunden	58 °C	
	40 Sekunden	68 °C	
	Schmelzkurve		

3.4 Southern Blot und Hybridisierung

Southern Blot und die anschließende Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden ist eine Möglichkeit, bestimmte Sequenzabschnitte in PCR-Produkten nachzuweisen. In einem ersten Schritt müssen die PCR-Produkte zusammen mit einem DNA-Leiter auf ein 1-1,5 %iges Gel aufgetragen werden. Für dieses Projekt wurde immer mit einem 1,5 % igem Gel gearbeitet. Für eine Hybridisierung ist eine ordentliche Auftrennung der PCR-Produkte besonders wichtig, vor allem wenn es sich um kleine Produkte mit einer Länge um 200 bp handelt. Danach wird das Gel mit Lineal abfotografiert und unter UV-Licht Marker anhand des Leiters in das Gel geritzt. Dieses wird nun 3 Mal 20 Minuten in 1 x Blotpuffer behandelt. Dadurch kommt es zu Denaturierung. Währenddessen wird eine positiv geladene Nylonmembran zu Recht geschnitten, kurz in autoklavierten H₂O geschwenkt und ebenfalls einmal 20 Minuten mit 1 x Blotpuffer behandelt. Durch Vakuum Blot (1 Stunde, 5 Hg) wird nun die DNA vom Gel auf die Membran übertragen. Im Anschluss müssen die Slots und Marker zur besseren Orientierung später mit Bleistift auf die Membran übertragen werden. Diese wird daraufhin noch 2 Mal 10 Minuten in 2 x SSC behandelt. Dieser Schritt dient zur Neutralisierung der

Membran. Um die DNA endgültig zu fixieren, wird sie in der UV Kammer (BioRad) bei 150 Joules (Programm: C3) gebacken. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der Membran mit den Sonden, alternativ kann die Membran an dieser Stelle bei -20 °C eingefroren und gelagert werden.

Für die Hybridisierung werden zwei Lösungen verwendet, die Vorhybridisierungslösung und die Hybridisierungslösung. Die Vorhybridisierungslösung besteht aus 3 ml 20 x SSC, 0,2 ml 1 M NaPP, 5,2 ml H₂O, 1 ml 50 x Denhardt, 0,1 ml t-RNA sowie 0,5 ml 10 % SDS (insgesamt 10 ml). Die Vorhybridisierung findet in einem Hybridisierungssofen bei 37 °C statt. Die Dauer beträgt 1,5 bis 2 Stunden. Die Membranen werden dazu zusammen mit der Vorhybridisierungslösung in eine Hybridisierungsröhre gegeben.

Die Hybridisierungslösung besteht aus 1,5 ml 20 x SSC, 0,1 ml 1 M NaPP, 0,1 ml 50 x Denhardt, 0,05 ml t-RNA sowie einer radioaktiven Markierung. Am Ende wird der Ansatz mit H₂O auf 5 ml Volumen aufgefüllt.

Die radioaktive Markierung der Hybridisierungslösung wird separat und in einem für radioaktive Arbeiten zugelassenen Raum angefertigt. Bei Arbeit mit radioaktiven Substanzen wird zum Schutz eine Plexiglasscheibe zwischen durchführender Person und Arbeitsplatz gestellt. Außerdem sollte über den gesamten Zeitraum des Versuchs ein Dosimeter getragen werden. Für die Markierung der Oligonukleotide wurde [gamma-P32]-ATP verwendet.

Reaktionsansatz:	10 x Phosphorylation buffer	2 µl
	Oligonucleotid 2 pmol/µl	3 µl
	[gamma-P32]-ATP	3 µl
	Polynucleotid Kinase	1 µl
	ddH ₂ O	11 µl
		Σ20 µl

Um die Labellingreaktion zu veranlassen, wird der Mix 30 Minuten bei 37 °C erwärmt. Um diesen abzustoppen, wird er auf Eis gestellt. Anschließend werden mini Quick Spin Columns (Roche) zur Reinigung von Nukleinsäuren eingesetzt und die Sonden nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Abschließend wird der Einbau des radioaktiven Materials in die Oligonukleotide gemessen und der Mix zur Hybridisierungslösung gegeben.

Die Hybridisierung wird ebenfalls in einem Hybridisierungssofen durchgeführt. Die Dauer beträgt 14 – 48 Stunden. Die Temperatur richtet sich nach der T_m der Oligonukleotide und beträgt $T_m - 5^\circ\text{C}$.

Die hybridisierte Membran wird im folgenden Schritt in 6 x SSC/0,02 M NaPP gewaschen: 3 Mal 10 Minuten bei 37°C und 2 Mal 30 Minuten bei $T_m - 5^\circ\text{C}$. Zum Schluss wird der Film aufgelegt. Die Belichtungsdauer ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Einbaurate und der Qualität der Sonde und kann zwischen 10 Minuten und mehreren Tagen betragen. Der Film wird 5 Minuten in der Entwicklerlösung entwickelt und danach 5 Minuten fixiert.

3.5 Identifizierung der molekularen Marker

3.5.1 DNA-Aufreinigung aus Agarosegel

Da eine Bande im Gelbild bei 1 kb ein Fusionstranskript nicht ausschließt, wurden grundsätzlich alle sichtbaren Banden ausgeschnitten und deren Amplikon-DNA aufgereinigt. Hierfür wurde das innuPREP DOUBLEpure Kit von Analytik Jena benutzt und nach beiliegendem Herstellerprotokoll vorgegangen. Die Elution erfolgte in etwa 10 μl ddH₂O.

3.5.2 Sequenzierung und Primerdesign

Die Sequenzierung der aufgereinigten DNA erfolgte mithilfe des HotShot-Verfahrens durch die Firma SeqLab (<http://www.seqlab.de/>). Zur Vorbereitung mussten 6 μl DNA mit 1 μl Primer (20 pmol/ μl) in ein Tube gegeben werden, welches daraufhin per Post verschickt wurde. In dieser Arbeit wurde der Primer 728for16 für diesen Zweck benutzt.

Für das Abgleichen der erhaltenen Sequenz mit dem HPV- bzw. zellulärem Genom wurden die Programme nucleotide blast von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sowie das BLAT-Programm der University of California, Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) verwendet. Die Referenzsequenz war GRCh37/hg19. Durch diesen Abgleich konnte man den HPV16-Anteil und/oder Anteil des zellulären Genoms identifizieren (Abb. 8). Auch die Untersuchung der Lage der Sequenz im Genom fand mit diesen beiden Programmen statt.

A CGGCTGTGCGTCAAGCACACACGTAGACATTTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTG
 CCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAATCTACCATGGCTGATCCTGCAGCAGCAACGAAGTATCCTCTCCTGAAACT
 ATTAGGCAGCACCTGGCCAACCACTCCGCCGCGACCCATACCAAAGCCGTCGCCTTGGGCACCGAAGAAACACAG
 ACGACTATCCAGCGACCAAGATCAGAGCCAGACACCGGAAACCCCTGCCACACCACTAAGTTGTTGCACAGAGAC
 TCAGTGGACAGTGCTCCAATCCTCACTGCATTTAACAGCTCACACAAAGGACGGATTAACTGTAATAGTAACACT

B CCTCGGTGGCGTCAAGCACACACGTAGACATTTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGT
 GCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAATCTACCATGGCTGATCCTGCAGCAAATGAAAGAACATTCAAAACAAGCA
 AGTTTAGAAGGCCAAAAAATTTATTGAGAATGTATGGATTGAATGTACTCCACATAAGAGGCATGGCTAAATGAA
 TGTTTCATCAAGGCCTGAGATGTGTGACCCCTAAGAAACAAGACTGATGGTTTAAATAAAGAACCAACAAAGACCAAG
 AAAAAAGATGAAAATGCTAACACTGAAAGATAAAACACCGGCTGCAGGATGTGGGAGAAATGTCTACTAACTGTA

Abb. 8: Beispiel einer Sequenz eines episomal abgeleiteten Transkriptes (A) und eines viralzellulären Fusintranskriptes (B) (rot-HPV Genom, grün-zelluläres Genom)

Lag ein viral-zellulärer Übergang vor, so konnten anhand der Sequenzen Primer für eine tumorspezifische nested-PCR (TS-PCR) abgeleitet werden. Beide Forward-Primer liegen im Bereich des HPV16-Genoms und waren daher für alle Fusionstranskripte gleich. Lediglich die zwei Reverse-Primer wurden für jeden Tumor neu abgeleitet und waren somit als molekulare Marker für diesen einen Patienten verwendbar. Sie lagen jeweils im zellulären Bereich. Im weiteren Verlauf des Projektes wurden zusätzlich Sonden für die Oligohybridisierung von den jeweiligen Sequenzen abgeleitet werden. Um die Tumorspezifität zu gewährleisten wurde die Primersequenz für die Sonde direkt auf den viral-zellulären Sequenzübergang gelegt.

Sowohl Primer als auch Sonden wurden bei Eurofins mwg Operon oder Sigma Aldrich bestellt.

4. Ergebnisse

Der Aufbau der vorliegenden Ergebnisse untergliedert sich in drei Abschnitte. In Vorversuchen wurde die Tumor-spezifische PCR (TS-PCR) etabliert und deren Sensitivität sowie Spezifität bestimmt. Im zweiten Teil folgen Ergebnisse durch APOT-PCR und die Bestimmung des HPV-Status der Proben. Hierbei ging es um die Aufbereitung und Untersuchung der Tumorproben um bei gefundenen Integrationsereignissen TS-PCRs zu designen. Als dritter Abschnitt erfolgte die Validierung der TS-PCRs als molekulare Marker anhand von präoperativen Abstrichmaterialien.

Des Weiteren wurden ausgewählte Patienten auch postoperativ nachverfolgt um eventuelle Rezidiventwicklungen nachweisen zu können.

4.1 Vorversuche zur Sensitivität der TS-PCR

Im Rahmen der Vorversuche wurden zuerst die nötigen Zellkulturen (SiHa, CaSki und C33A) kultiviert, abgeerntet und anschließend eine semi-nested-PCR wie in Punkt 3.3.4.1 beschrieben durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine mit der TS-PCR vergleichbare PCR.

4.1.1 Zellkulturarbeiten

Die drei Zelllinien SiHa, CaSki und C33A ließen sich problemlos kultivieren. Ein Mediumwechsel der Kulturen wurde mindestens alle drei Tage durchgeführt. Nach Überprüfung der Zelldichte mit dem Mikroskop fand das Splitting in regelmäßigen Abständen statt. Über beide Vorgänge wurde laborintern Protokoll geführt.

Die Zellernte erfolgte bei CaSki in Passage (p) 8, bei SiHa in p 4 und bei C33A in p 9. Der Mykoplasmentest, der mit allen drei Zelllinien durchgeführt worden war, blieb negativ. Es lagen also keine Bewachung oder Kontamination der Materialien vor. Die Zelllinien wurden nach Beendigung der Arbeiten wieder bei -180 °C eingefroren.

Aus den geernteten Zellen wurde mit dem NucleoSpin® RNAII-Kit nach Herstellerprotokoll RNA gewonnen.

Die genauen Passagen zum Zeitpunkt der einzelnen Schritte sowie die Menge an gewonnener RNA sind in Tabelle 6 dargestellt. Die RNA der drei Zelllinien wurde im weiteren Verlauf für Sensitivitätstests und als Kontrollen für PCR-Läufe (zum Beispiel TS-PCR) eingesetzt.

Tabelle 6: Auflistung der kultivierten Zelllinien mit Passage zum Zeitpunkt der Ernte und gewonnener Menge an RNA

Zelllinie	Passage beim Einfrieren	Passage bei Ernte	Menge RNA in ng/µl
SiHa	p24	p4	389,36
CaSki	p22	p8	847,92
C33A	p16	p9	1106,08

4.1.2 Sensitivitätstest mit Hilfe einer semi-nested-PCR und Oligohybridisierung

Im Rahmen von Vorarbeiten sollte die Sensitivität der späteren tumorspezifischen PCR (TS-PCR) nachgewiesen werden.

Wie beschrieben wurden Verdünnungsreihen von SiHa-RNA, stellvertretend für HPV-positive Tumorzellen, hergestellt und vor einem Hintergrund von jeweils 200 ng C33A, stellvertretend für HPV-negative RNA, in einer semi-nested-PCR eingesetzt (siehe Kapitel 3.3.4.1).

Es konnte dabei Material in den Verdünnungsstufen 160 pg, 80 pg, 40 pg, 20 pg und 10 pg nachgewiesen werden. Höhere Verdünnungen blieben negativ, ebenso die Negativkontrollen (10 ng CaSki-RNA und ddH₂O/NTC).

Die Ergebnisse der PCR sowie der Oligohybridisierung nach Southern Blot sind in Abb. 9 dargestellt. Nach Durchführung der Gelelektrophorese zeigten sich Banden in den Verdünnungsstufen bis 10 pg. In Abb. 9 kann man ein deutliches Signal bei ca. 150 bp in den Verdünnungsstufen 160 pg, 80 pg, 40 pg, 20 pg und 10 pg erkennen. Aufgrund von bekannter Sequenz von SiHa und der eingesetzten Primer wurden Produkte von 155 bp Länge erwartet. Allerdings zeigten sich im Gel auch Banden unterschiedlicher Größe in anderen Proben: CaSki 10 ng (etwa 50 und 250 bp), 0,625 pg SiHa mit 100 ng C33A (600 bp) und 2,5 pg SiHa mit 100 ng C33A (500 bp). Da diese Banden nach Oligohybridisierung nicht mehr zu sehen waren, handelte es sich vermutlich um Artefakte. Die Proben wurden als negativ bewertet. Nach Southern Blot und der Oligohybridisierung mit einer SiHa-spezifischen Sonde waren nur noch Signale in den Verdünnungsstufen von 160 pg, 80 pg, 40 pg, 20 pg und 10 pg SiHa-RNA mit einer Länge von etwa 150 bp nachweisbar. Nur diese Proben können als richtig positiv gewertet werden.

Der Nachweis von SiHa-RNA gelang somit bis zu einer Menge von 10 pg (~ 0,5 Zellen) mit 100 ng C33A (~ 5000 Zellen) im Hintergrund. Dieses Ergebnis konnte bei zweimaliger Durchführung des Versuches reproduziert werden.

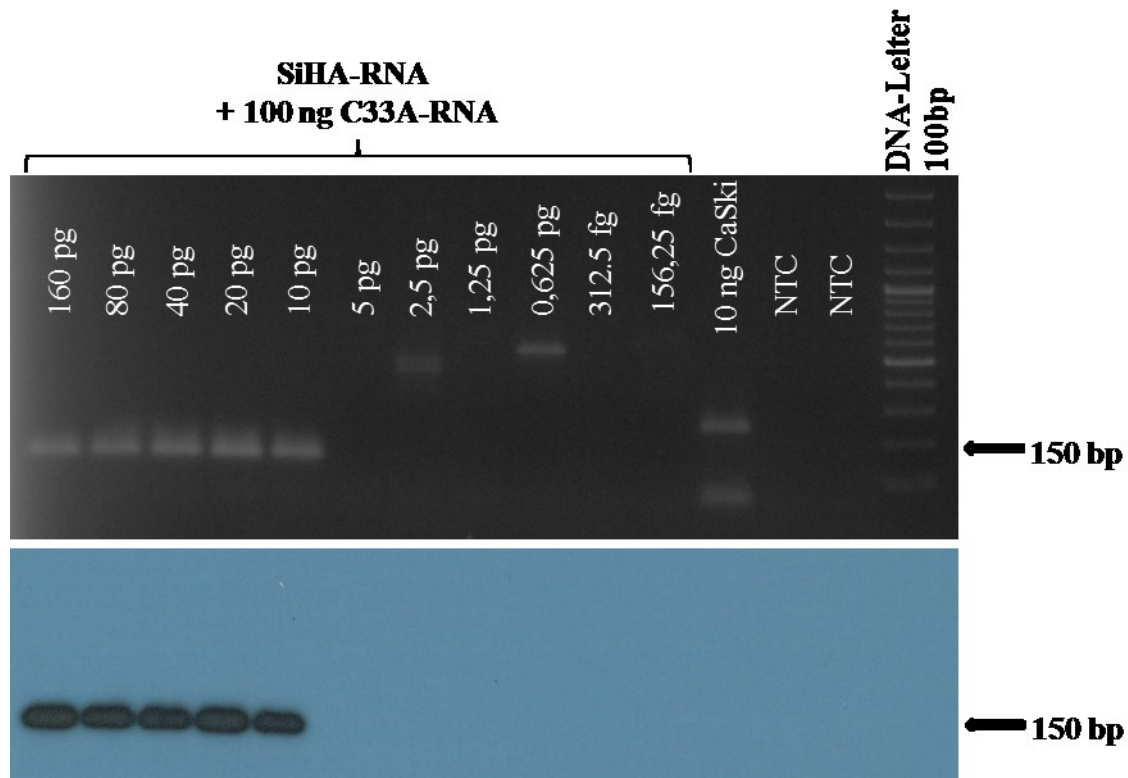


Abb. 9: Ergebnis der semi-nested-PCR mit einer SiHa-Verdünnungsreihe in Gelelektrophorese (oben) und nach Southern Blot/Oligohybridisierung (unten)

4.2 Aufbereitung und Untersuchung der Tumorbiopsien

Im Vordergrund dieses Abschnittes des Projektes standen das Sammeln geeigneter Patientenproben sowie die Aufbereitung dieser. Nach RNA-Extraktion aus den Tumorbiopsien erfolgte der Schritt der cDNA-Synthese. Anschließend wurde diese mittels APOT-PCR auf eventuell vorhandene viral-zelluläre Fusionstranskripte untersucht.

4.2.1 Probenakquirierung und Aufbereitung des Probenmaterials

Von 42 Patienten erfüllten lediglich 38 die Kriterien zum Einschluss in das Projekt: histologisch Plattenepithelkarzinom und Karzinom des Oropharynx. Ein Patient (Nummer 5) musste ausgeschlossen werden, da von ihm lediglich Abstriche, jedoch keine Tumorbiopsie vorlagen und somit die APOT-PCR nicht möglich war. Bei drei weiteren Patienten stellte sich in der nach Probenentnahme stattfindenden histologischen

Untersuchung heraus, dass kein Plattenepithelkarzinom sondern ein Lymphom vorlag (Patienten Nummer 13, 15 und 19). Dennoch wurden auch Proben dieser Patienten aufbereitet und auf HPV 16 untersucht. Für die Auswertung im Hinblick auf den Zusammenhang HPV 16 und Karzinogenese beim Tonsillenkarzinom spielten sie keine Rolle mehr. Verwendung fanden diese im Verlauf ggf. als (negative) Kontrollproben.

Von 38 Patienten mit histologisch gesichertem Plattenepithelkarzinom hatten 30 ein definitives Tonsillenkarzinom. Bei fünf Patienten war ein Oropharynxkarzinom ohne nähere Spezifizierung vorzufinden und lediglich drei Tumore waren an anderer Stelle lokalisiert (Zungenboden und Mundboden, in anatomischen Zusammenhang mit der Tonsillenregion).

Details zu Tumorgröße und Lymphknotenbefall sind in Tabelle 7 dargestellt. Details zur TNM-Klassifikation sind im Anhang in Tabelle 12 und 13 zu finden. Nur zwei Patienten hatten bereits hämatogene Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Patienten Nummer 26 und 1).

Tabelle 7: Tumorgröße und Lymphknotenbefall der 38 Patienten mit gesichertem Plattenepithelkarzinom

	N0	N1	N2	N3	gesamt
T1	1	0	4	2	7
T2	2	4	11	0	17
T3	1	1	2	0	4
T4	4	0	6	0	10
gesamt	8	5	23	2	38

Eine RNA-Extraktion aus dem Tumormaterial erfolgte wie im Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben mit dem NucleoSpin® RNAII Kit.

Anschließend wurde die Tumor-RNA spektrophotometrisch vermessen. Bei drei der zweiundvierzig Proben wurden Werte unter 50 ng/µl (Patienten Nummer 4, 6 und 9) und bei einer ein Wert unter 10 ng/µl (Patient Nummer 26) gemessen. Letztere befand sich nach Entnahme fälschlicherweise für kurze Zeit in Formalin statt in RNALater. Bei den anderen Proben wurden gute Ratios gemessen, welche idealerweise ~ 2 sein sollten. Bei 38 von 42 RNA-Proben befanden sich diese zwischen 2 und 2,15. Drei Proben hatten Werte unter 2 (Patient Nummer 26, 31, 37). Ohne Tumorbiopsie konnte bei Patient Nummer 5 keine RNA extrahiert werden und demzufolge auch keine Messung erfolgen. Die genauen

Werte aus den Vermessungen der Tumor-RNA sind tabellarisch im Anhang dieser Arbeit aufgelistet (Tabelle 14).

Die durch reverse Transkription gewonnene cDNA wurde in einer β -Aktin-PCR eingesetzt, um die Qualität der entstandenen cDNA zu beurteilen. Bei positivem Ergebnis wurden Banden mit einer Länge von etwa 300 bp erwartet. Als positive Kontrollproben wurde cDNA von CaSki, SiHa und C33A verwendet. Diese zeigten in allen Läufen erwartungsgemäß ein starkes Signal. Die NTC (ddH₂O) blieb stets negativ.

Beispielhaft ist das Gelbild nach einer β -Aktin-PCR in Abb. 10 aufgezeigt. Bis auf die Probe von Patient Nummer 26 geben alle Proben plus die Positivkontrollen ein starkes Signal, was ein Zeichen für eine gute Materialqualität ist. Die NTC ist negativ. Es liegt keine Kontamination vor. Auch die Probe von Patient Nummer 26 ist positiv, aber wesentlich schwächer.

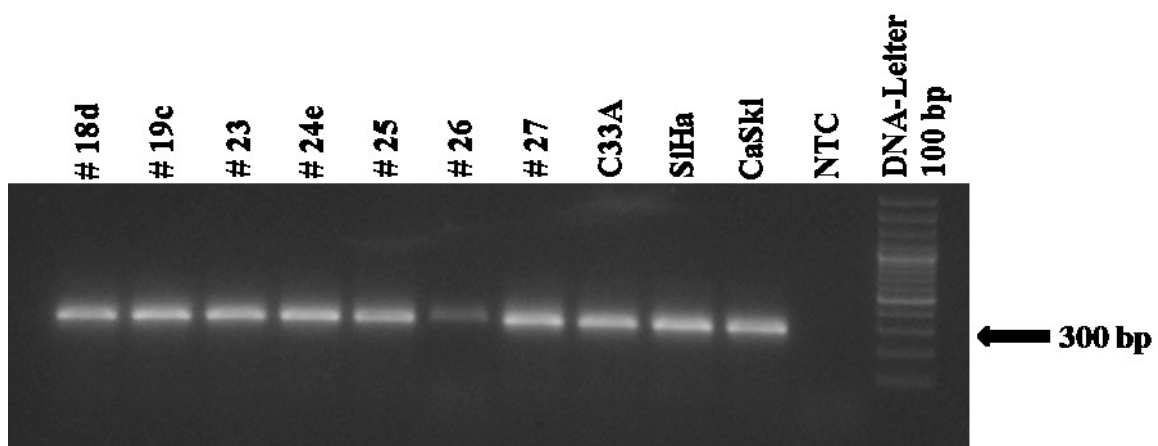


Abb. 10: Beispiel einer β -Aktin-PCR an cDNA der Tumorproben

Die PCR fiel auch für alle weiteren untersuchten Proben positiv aus. Das heißt, auch hier zeigten sich starke Signale mit einer Länge von 300 bp. Ausnahme bildet die oben genannte Probe von Patient Nummer 26.

Die Abstrich-RNA wurde aufgrund der nur geringen Menge (20 μ l) nicht photometrisch vermessen um Material nicht unnötig zu verbrauchen. Wurden die Abstriche für weitere Versuche benötigt, wurde eine β -Aktin-PCR im Sinne einer one-step-PCR durchgeführt und so der RNA-Gehalt überprüft. Die Ergebnisse sind im im Kapitel 4.8 beschrieben.

4.2.2 APOT-PCR

Zur Identifizierung viral-zellulärer Fusionstranskripte wurde die APOT-PCR an den 41 Tumorbiopsien durchgeführt, bei denen Tumormaterial vorlag. In Abb. 11 ist das Ergebnis einer APOT-PCR im Gelelektrophorese-Bild exemplarisch dargestellt.

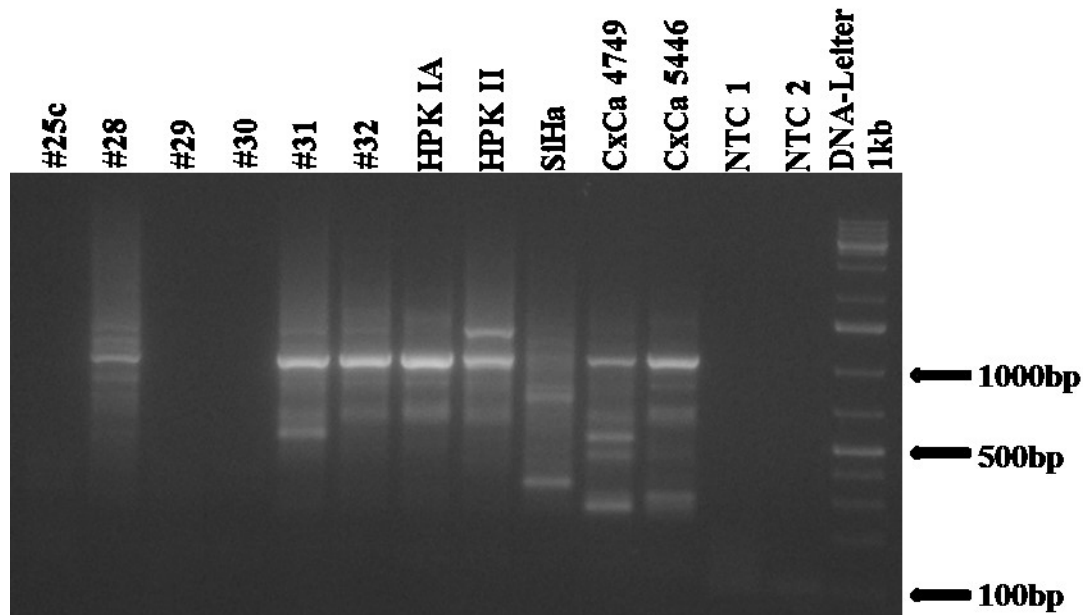


Abb. 11: Exemplarisches APOT-Ergebnis im Rahmen dieser Arbeit

Zu den anderen Läufen unterscheidet sich dieses lediglich in den Patientenproben (mit # versehen). Positiv- sowie Negativkontrollen blieben in allen Versuchen konstant.

Bei HPKIA und HPK II handelt es sich um durch HPV 16 immortalisierte Zelllinien humaner Keratozyten (Durst et al. 1991). Bekanntermaßen liegen die Produkte einer APOT-PCR hier bei 1000 bp (Hinweis auf episomal abgeleitete Transkripte). SiHa ist eine aus einem Zervixkarzinom abgeleitete Zelllinie mit integriertem HPV 16-Genom. Die Bande ist bei etwa 300 bp Länge zu erwarten. Bei CxCa4749 und CxCa5446 handelte es sich um Tumorproben aus zervikalen Neoplasien, welche bereits vor Beginn dieser Arbeit im Rahmen eines anderen Projektes laborintern analysiert wurden. Beide Tumore weisen durchgehend Banden bei 1000 bp-Länge auf. Zusätzlich dazu sind verschiedene kürzere DNA-Fragmente zu sehen (etwa bei 250, 450, 550 und 700 bp bei CxCa4749 und etwa bei 300 und 800 bp bei CxCa5446).

Daneben kann man neben diesen Positivkontrollen auch die Negativkontrollen (NTC/ddH₂O) sehen. Da es eine PCR in zwei Schritten war, gab es in jedem Fall zwei

Negativproben (NTC 1 und 2, wobei Nummer 1 aus der ersten und Nummer 2 aus der zweiten Teil-PCR stammt).

Im Beispiel in Abb. 11 sind die Proben der Patienten Nummer 25c, 29 und 30 HPV-negativ, 28, 31 und 32 HPV-positiv. In späteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass Nummer 28 ein Integrat enthält, HPV-DNA in Nummer 31 und 32 episomal vorliegt.

Bereits nach diesem Schritt konnte zwischen HPV-positiven und –negativen Tumoren unterschieden werden.

Im Falle einer HPV 16-positiven Probe waren Banden immer problemlos sichtbar und für die DNA-Aufreinigung exzisierbar. Im Falle mehrerer Banden, die eng nebeneinander lagen, und dadurch resultierender schwerer Trennbarkeit wurde der APOT-Versuch mitunter ein zweites Mal durchgeführt um die Banden im Gelbild weiter aufzutrennen.

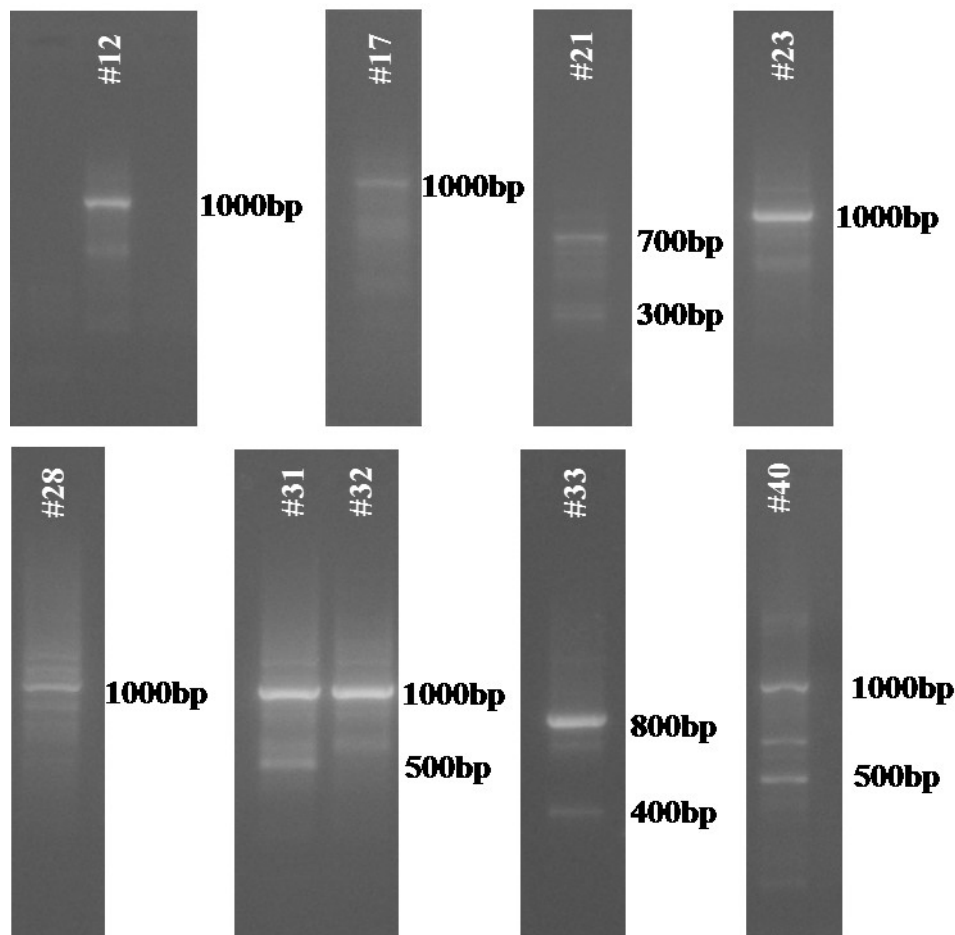


Abb. 12: Gelbanden aller 9 HPV-positiven Tumorproben

HPV 16-RNA war in neun der 38 Tumorbiopsien detektierbar. Dies entspricht 23,68% (9/38). Von den HPV 16-positiven Proben waren acht in der Tonsille und eine im Oropharynx lokalisiert. Alle im Gelbild sichtbaren Banden – auch solche, die mit einer Größe von 1000 bp eher für ein episomal abgeleitetes HPV 16-Genom sprachen – wurden aufgearbeitet und sequenziert. Bei einigen Proben waren mehrere Banden sichtbar. Auch bei solchen Proben wurden immer alle sichtbaren Banden ausgeschnitten.

Die jeweiligen Gelbilder der neun positiven Proben sind in Abb. 12 dargestellt. Aus Platzgründen werden hier die Positiv- sowie Negativkontrollen und der DNA-Leiter nicht gezeigt. Diese verhielten sich analog der Darstellung in Abb. 11.

4.3 Sequenzierung und Etablierung molekularer Marker

Nachdem alle Tumorbiopsien, welche die Kriterien erfüllten, untersucht worden waren, konnten mit Hilfe der viral-zellulären Fusionstranskripte molekulare Marker abgeleitet werden (Kapitel 3.5.2). Die so entwickelten Primer wurden zuerst an Tumor-cDNA getestet und danach an RNA der präoperativen Abstriche angewendet.

Die Sequenzierung bei der Firma SeqLab war innerhalb weniger Tage abgeschlossen und konnte im Labor ausgewertet werden. Durch Abgleich mit den Datenbanken von NCBI und UCSC stellte sich heraus, dass bei 7 der 9 HPV 16-positiven Proben die Sequenz rein viral war. Es handelte sich hierbei um die Proben der Patienten Nummer 12, 17, 21, 23, 31, 32 und 40. Die Übereinstimmungen mit dem HPV 16-Genom betrugen jeweils über 95% und es waren keinerlei Gemeinsamkeiten mit zellulären humanen Sequenzen vorhanden.

CGGCTGTGCGTCAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATG
GGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAATCTACCATGG
CTGATCCTGCAGCAGCAACGAAGTATCCTCTCCTGAAACTATTAGGCAGCACCTG
GCCAACCCTCCGCCGCGACCCATACCAAAGCCGTCGCTTGGGCACCGAAGAA
ACACAGACGACTATCCAGCGACCAAGATCAGAGCCAGACACCGGAAACCCCTGC
CACACCACTAAGTTGTTGCACAGAGACTCAGTGGACAGTGCTCCAATCCTCACTG
CATTTAACAGCTCACACAAAGGACGGATTAAGTGAATAGTAACACTACACCCAT
AGTACATTTAAAAGGTGATGCTAATACTTTAAAATGTTTAAGATATAGATTTAAA
AAGCATTGTAAATTGTATACTGCAGTGTCTACATGGCATTGGACAGGACATA
ATGTAAACATAAAAGTGCAATTGTTACACTTACATATGATAGTGAATGGCAACG
TGACCAATTTTTGTCTCAAGTTAAAATACCAAAACTATTACAGTGTCTACTGGAT
TTATGTCTATATGACAAATCTTGATACTGCATCCACAACATTACTGGCGTGCTTTT
TGCTTTGCTTTTGTGTGCTTTTGTGTGTCTGCCTATTAATACGTCCGCTGCTTTTGT
CTGTGTCTACATACATCATTAACTATTGGTATTACTATTGTGGATAACAGCA
GCCTCTGCGTTTAGGTGTTTTATTGTATATATTGTATTGTGTTTATATACCATTATT
TTAATACATACATGCACGCTTTTTAATTACATAATGTATATGTACATAATGTAA
TTGTTACATATAATTGTTGTATACCANAACCTACTATTTTTCTTTTATTTTTATA
TANAATTTTTTTTTNGG

Abb. 13: Beispielsequenz eines rein viralen Transkriptes

Ein Beispiel einer rein viralen Sequenz ist in Abb. 13 gezeigt. Die rein viralen Sequenzen zeigten alle ein Spleißmuster auf. Eine reguläre Sequenz umfasste ca. 1000 Basenpaare. Der Spleißdonor lag bei der Nukleotidposition 880 des HPV-Genoms, also im Bereich des E1-ORF (unterstrichen). Spleiß-Akzeptor war in allen Fällen an Position 3356 im Bereich vom E4-ORF (nicht unterstrichen).

Nicht alle Banden rein viraler Sequenzen hatten eine Größe von 1000 bp. Bei Proben der Patienten Nummer 21 und 33 lagen die Banden auf Höhe von jeweils 700 bp/300 bp und 800 bp/400 bp. Proben der Patienten Nummer 31 und 40 hatten eine zusätzliche Bande bei jeweils 500 bp. In der Sequenzierung zeigten sich auch hier rein virale Sequenzen mit oben erwähntem Spleißmuster vom E1-Genom zum E4-Genom. Die Sequenz war nur am Ende ein bisschen kürzer.

Zwei Proben (Patienten Nummer 28 und 33) wiesen ein viral-zelluläres Fusionstranskript auf. Das sind 5,26 % (2/38) aller Plattenepithelkarzinome. Die jeweiligen Sequenzen sind in den Abb. 14 und 15 dargestellt (rot entspricht dem viralen, grün dem zellulären Anteil). Wie schon bei den rein viralen Sequenzen handelte es sich bei dem Spleiß-Donor um die Nukleotidposition 880. Der Akzeptor lag in beiden Fällen direkt im zellulären Genom. Bei Nummer 28 lag der Akzeptor auf dem Chromosom 6q23.3, bei Nummer 33 auf 4q12.

```
GTGTGCGTCAAGCACACACGTAGACATTTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGC
ACACTGGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAATCTACCATGGCTG
ATCCTGCAGTTTTCTTTAACTGTCAGGAAATAAATGAGACAGCATTCTGAGAAGG
ATCTAGAGGTGCCACCACGAACATTCTGAAGGAGGCTGATAGAGCGGACAACCC
ACCAAGTCTGGGAGTTGACTTGACAGCCCTGCCACGAGAAGCTGGCTAAGACA
GCACAGTAGAAATGTGGCCTGAAGATTGGGGCACAACACAGCACAAATCTATC
ATAACCGAGTCTTAAATTTGCTTTACATGTGAAAACCATATACTCACACACCAAC
AAGAACTCACCCCAGCTGGCCTAAGCTAAGGAATCTACAGTCCTTGGA AAAAGA
ACAAGTCAGAAGAAAGAACTTCAGGATCCTTCCAGCTGTTTCCCATGATTTATCA
TTCTTACAGTGTAGCCGCTTCAAAATACTTTTTTAACTTCATGCTATGAATTCCAA
ACACATTTAAGGTTAACCTCTGTCTTTGGTGTGATATAAGACCACTTATGGCACTC
TGCTTTTTCTTGGTTGGCTTTTACATTTCTTTCATGCATGCCCTGTTTTCCAGTAA
AGTAACCCATATCCAGGGCCTTGACTAGCTCTACTTTTGAGTCAACTAATATTTG
CTGTTTCCACGTGGCAGGTGTGACCTTAGACCAGGTGCTATGAGTTAAACGAAGA
TGAATGAGACTTGGACCCTGCCCTTAAATATTCAAACCAGCTAACGGTTGGTGGT
TAAACTCTGGACTCAGACAGACCTGGGGTGGAATTCGGGCTTCTCTACCTACCAG
CTTGGGCAAGTTATTTACATTCTTCTAAATTCCCCCTTTTTTTCCCCCACAACCTGC
GCATGATATTATCTACCTCATAGGCTTGCCATGAAGATTAGTTGACTAATAAAGT
GCAGTGCCACATAGTAAACCAAAAAAAAAAAAAATANNNNNTAN
```

Abb. 14: Sequenz des viral-zellulären Fusionstranskriptes bei Probe Nummer 28

Hinter Probe 28 steht ein männlicher Patient mit Geburtsjahr 1953. Es handelt sich hierbei um ein basaloides Plattenepithelkarzinom der linken Tonsille im Stadium pT2 pN2b (4/12)

cM0. Nach der Behandlung war kein Residualtumor mehr vorhanden (R0), es lag allerdings bereits Venen- und Lymphgefäßinvasion vor (L1 und V1). Der Tumor ist mit einem Grading von G3 schlecht differenziert. Bei dem Patienten wurde eine operative Tumortonsillektomie mit Defektdeckung mittels Radialislapen und anschließend eine adjuvante kombinierte Radiochemotherapie durchgeführt.

Nach Analyse mit UCSC und NCBI zeigt sich, dass der zelluläre Anteil der Sequenz auf dem Chromosom 6q23.3 auf dem Plusstrang befindet. Die Sequenz selber befindet sich nicht im Bereich eines Protein-codierenden Gens. Nach Abgleichung mit Genscan ergibt sich eine Lage auf einem hypothetischem Gen (chr6_69.10). Es gibt keine fragile sites auf 6q23.3 und keine ESTs in der gefundenen Sequenz. Die nächstgelegenen bekannten Gene sind OLIG3 (229k bp am 5'-Ende) und TNFAIP3 (147k bp am 3'-Ende).

```
CCTCGGTGGCGTCAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAAT
GGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAATCTACCATG
GCTGATCCTGCAGCAAATGAAAGAACATTCAAAACAAGCAAGTTTAGAAGGCCAA
AAAACTTTATTGAGAATGTATGGATTGAATGTACTCCACATAAGAGGCATGGCTA
AATGAATGTTTCATCAAGGCCTGAGATGTGTGACCCTAAGAAACAAGACTGATGGT
TTAATAAAGAACCAACAAAGACCAAGAAAAAAGATGAAAATGCTAACACTGAAA
GATAAACACCCGGCTGCAGGATGTGGGAGAAATGTCTACTAACTGTAAAGCATG
TGGTTTGAGGTGTTTCATCTGCAAGGACGTGTATTGAGAAAAACAAATGGTGGTTG
GCCTATGCTTTTCTCATGAAGCAGAGCAACTCCAGCAGCCTGAGAGAAGGCAGA
AAGACACATAGATTAATTTATCTTGCTCAGAGATACAGAGTCTGTCTAAGAAGAA
TTGAATATGTGAGTGCTGTCTTTTGAGATGGACATAGAACTCTTCTTCCCCTACC
CCAACCCAAATTTCTAGATTTATTGGAGACAACAATCTCCCTAAACAACATGG
TGGGTGTATGTGTGTGTAGCAAATGCATTATATAAGGCTGGCTCCTCATAAGT
AATAAATAAAATAATAAGATGTGAGTGGAACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
AAAAANANCNNNNCNNTNNNCCNCNNNNNCNNNNNTTNA
```

Abb. 15: Sequenz des viral-zellulären Fusionstranskriptes bei Probe Nummer 33

Bei Probe 33 handelt es sich um eine weibliche Patientin (Geburtsjahr 1952) mit einem nicht keratinisierenden Plattenepithelkarzinom der rechten Tonsille. Der Tumor befand sich im Stadium pT2 pN1 M0. Es war noch keine Venen- und Lymphgefäßinvasion vorzufinden (V0 und L0) und der Tumor konnte restlos entfernt werden (R0). Allerdings war auch dieses Karzinom schlecht differenziert (G3). Die Patientin wurde operativ und anschließend mit einer adjuvanten Radiochemotherapie behandelt.

Diese Sequenz befindet sich auf dem Plusstrang bei Chromosom 4q12. Auch hier ist laut Genscan zwar ein hypothetisches Gen (chr4_27.66), aber kein bekanntes. Die nächsten bekannten Gene sind KIT (277k bp am 5'-Ende) und KDR (63k bp am 3'-Ende). Es

befindet sich eine fragile site auf 4q12, allerdings nicht an der Position der Sequenz. Dort sind zwei ESTs bekannt: HY085706 und HY068066.

Mit Hilfe der Sequenzen wurden die Reversprimer und die Sonden abgeleitet. Diese sind in Tabelle 8 dargestellt. Reverse-Primer 1 wurde in der 1. PCR, Reverse-Primer 2 in der 2. PCR eingesetzt.

Tabelle 8: Primer für die TS-PCR

	28	33
Reverse-Primer 1	AGC CTC CTT CAG AAT GTT CG	CAC ATC TCA GGC CTT GAT GAA C
Reverse-Primer 2	GTG GTG GCA CCT CTA GAT CC	AGC CAT GCC TCT TAT GTG GA
Sonde	GGC TGA TCC TGC AGT TTT CTT	CTG ATC CTG CAG CAA ATG AA

4.4 Validierung der molekularen Marker an cDNA

Da von der RNA der jeweiligen Tumorbiopsien lediglich begrenzt Material vorlag, wurde beschlossen, die Primer an cDNA mittels TS-PCR zu testen (siehe Kapitel 3.3.4.3).

4.4.1 Probe zu Patient Nummer 28

Das Ergebnis der TS-PCR ist in Abb. 16 dargestellt.

Es entstanden nur Produkte, wenn Material des Zieltumors eingesetzt worden war. Die negativen Kontrollproben setzten sich zusammen zum einen aus der NTC (ddH₂O)-Probe sowie diversen Tumor-cDNAs (Tumornummern T246H, T282H und 17 als HPV Typ 16-positive Tumore und 2 als HPV Typ 16-negativer Tumor). Sie zeigen im Gelbild nach Elektrophorese keine Banden.

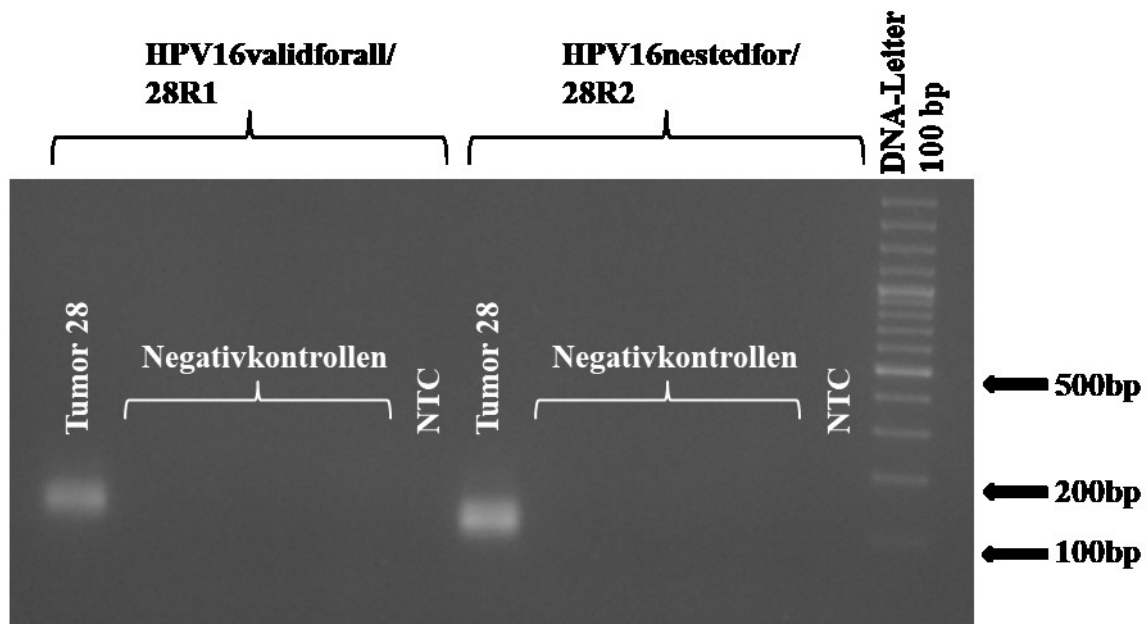


Abb. 16: Ergebnis der TS-PCR an cDNA des Tumors von Patient Nummer 28

In der grafischen Auswertung der Real-Time-PCR waren deutlich Produkt- und Schmelzkurven der PCR-Produkte der Tumorproben 28 sichtbar, wohingegen dies bei den Kontrollproben ausfiel (Abb. 17). 28 R1 bezeichnet die Primerkombination HPV16validforall/28 R1, 28 R2 HPV16nestedfor/28 R2.

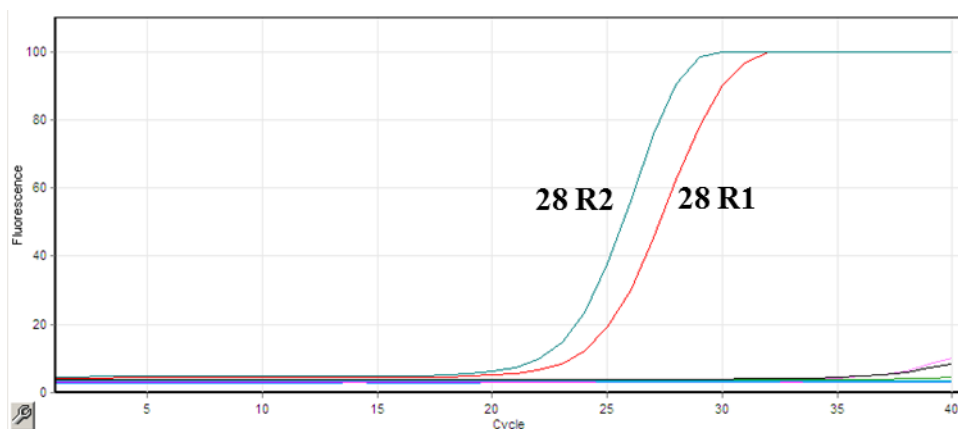


Abb. 17: Graphische Auswertung der TS-PCR an cDNA des Tumors von Patient Nummer 28

4.4.2 Probe zu Patient Nummer 33

Das Entwerfen des Primers für Probennummer 33 stellte sich als schwierig heraus, da es viele potentielle Interaktionen der möglichen Primer untereinander gab. Deshalb wurden verschiedene Reverse-Primer ausgetestet. Die besten Ergebnisse lieferten die Primer

33R1neuA und 33R2. Die Ct-Werte zeigten sich bei diesen am niedrigsten. Außerdem zeigten sich Produkte nur, wenn Material des Zieltumors eingesetzt wurde. Die Gelelektrophoresebilder der PCR sind in Abb. 18 dargestellt. Bei den Negativkontrollen handelt es sich um die gleichen Tumor-cDNAs wie in Kapitel 4.4.1.

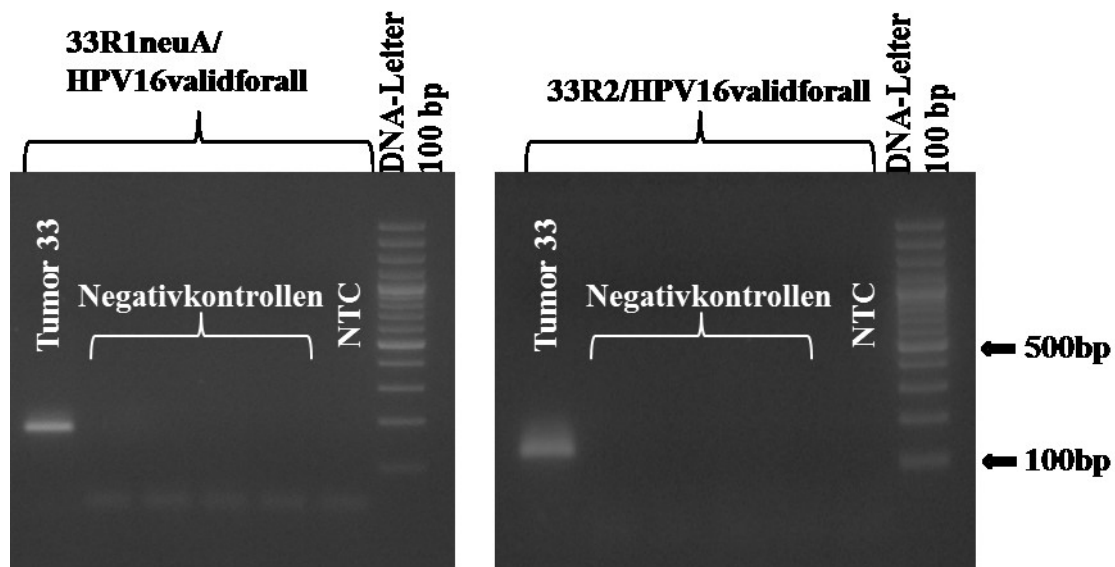


Abb. 18: Ergebnis der TS-PCR an cDNA des Tumors von Patient Nummer 33

Auch hier konnten per Real-Time-PCR Ergebnisse als Grafik dargestellt werden (Abb. 19). Bei dem Primerpaar 33R1neuA/HPV16validforall (in der Abbildung als 33R1neuA bezeichnet) entstanden außer bei cDNA des Zieltumors auch Produkte in den Kontrollproben. Dabei ist die Ct wesentlich höher als in der eigentlichen Tumorprobe. Am wahrscheinlichsten handelt es sich dabei um Primerdimere (siehe Gelbild, Abb. 17). 33R2 bezeichnet das Primerpaar 33R2/HPV16validforall.

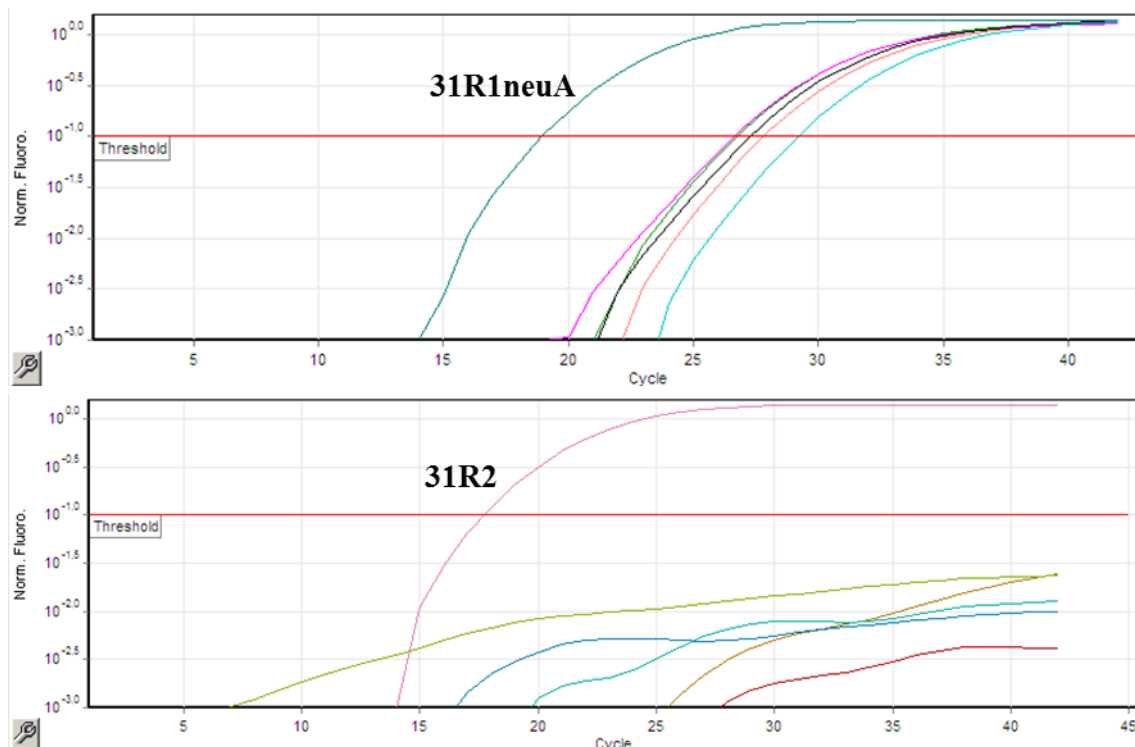


Abb. 19: Graphische Auswertung der TS-PCR an cDNA des Tumors von Patient Nummer 33

4.5 TS-PCR an RNA der präoperativen Abstriche

Die TS-PCR erfolgte an aus präoperativen Abstrichen gewonnener RNA. Als Positivkontrollen wurden dabei eine Verdünnungsreihe der Tumor-RNA in den Stufen 200 ng, 20 ng, 2 ng, 0,2 g und 0,02 ng vor dem Hintergrund von 200 ng C33A-RNA mitgeführt, NTC ist wieder ddH₂O.

4.5.1 TS-PCR Patient Nummer 28

Das Ergebnis für die Tumorprobe #28 ist in Abb. 20 zu sehen. Bei den Negativkontrollen handelt es sich um Tumor-RNA von T246H, T282H, 17 und 2 (jeweils ein Slot), C33A sowie um ddH₂O (NTC). Sulcus und Tumor bezeichnen die jeweiligen präoperativen Abstriche.

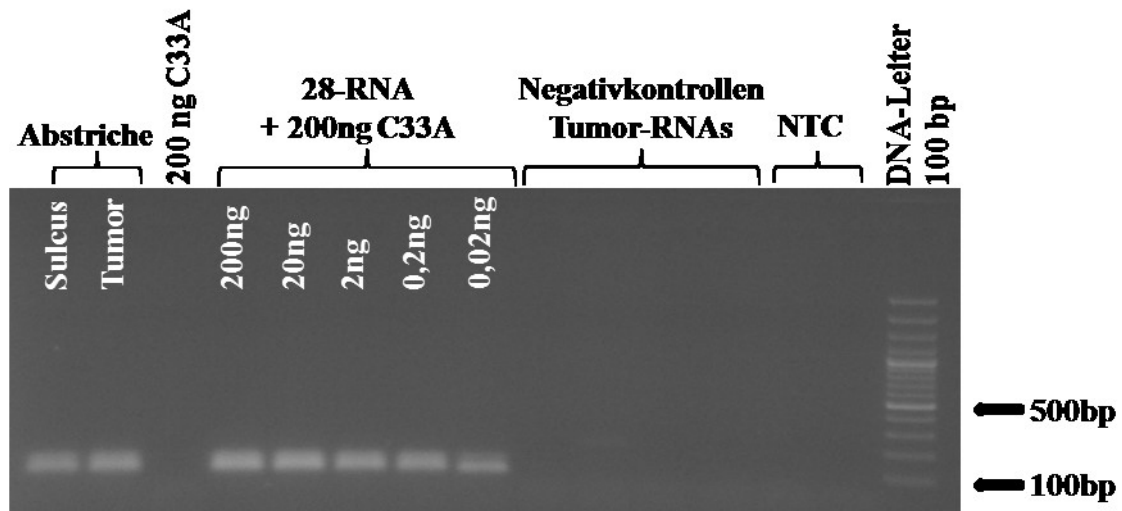


Abb. 20: Ergebnis der TS-PCR an präoperativen Abstrichen Patient Nummer 28 in der Gelelektrophorese

In beiden präoperativen Abstrichen konnten durch die TS-PCR Produkte bei ca. 150 bp Länge nachgewiesen werden. Des Weiteren gaben alle fünf Verdünnungsstufen der Tumor-RNA ein Signal, wohingegen C33A, Negativkontrollen und NTC negativ blieben. Durch die Oligohybridisierung konnte das Ergebnis bestätigt werden (Abb. 21).

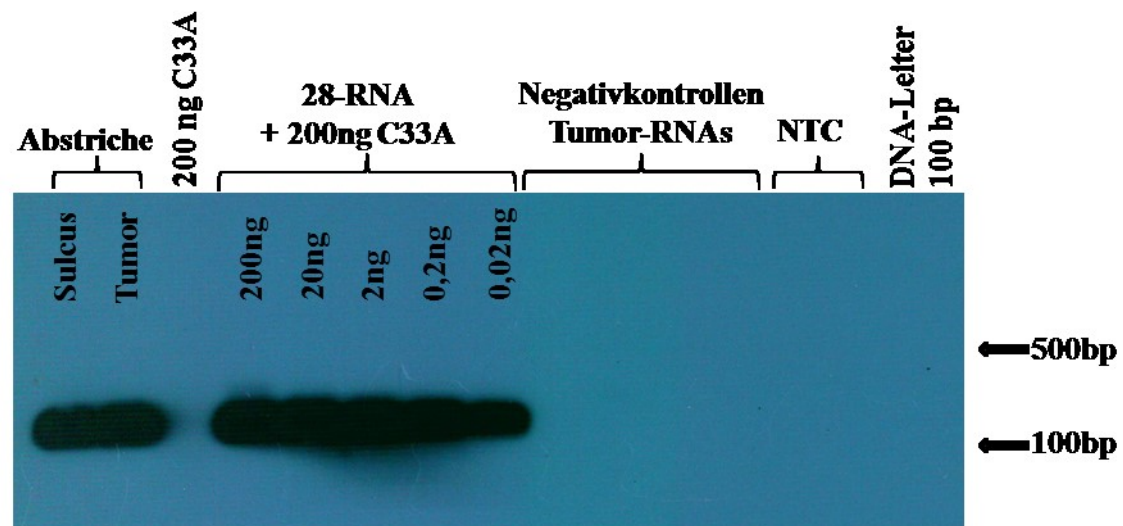


Abb. 21: Ergebnis der TS-PCR an präoperativen Abstrichen Patient Nummer 28 nach Southern Blot und Oligohybridisierung

In der β -Aktin-PCR zeigten beide Abstriche ein Signal und können damit als positiv gewertet werden (siehe Abb. 22).

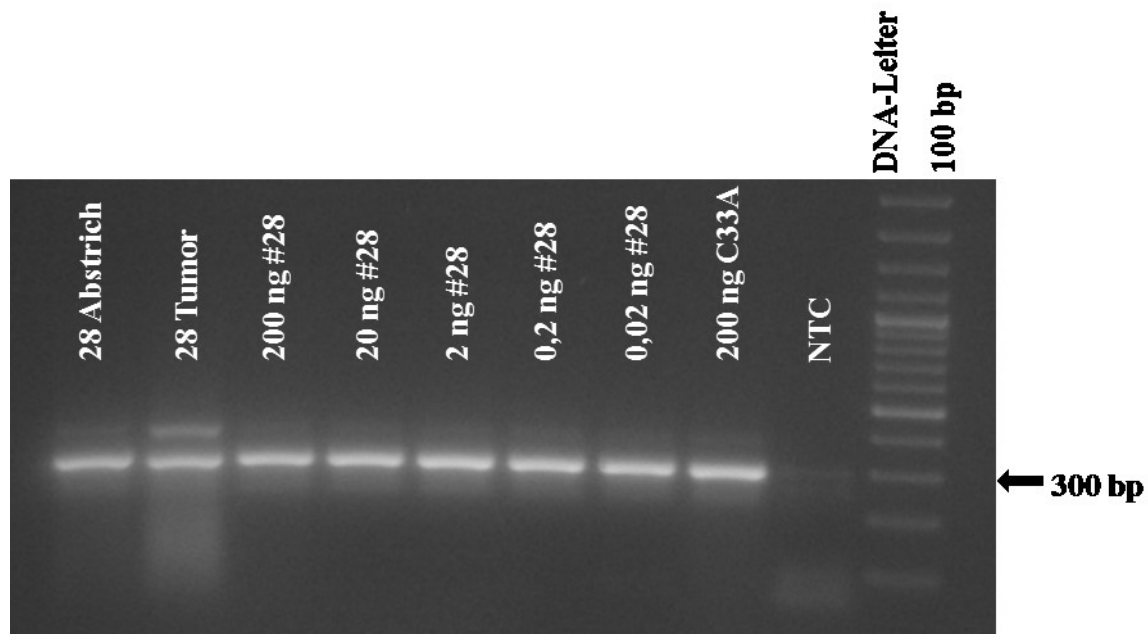


Abb. 22: β -Aktin-PCR der präoperativen Abstriche

Als Positivkontrollen kamen auch hier wieder verschiedene Verdünnungsstufen (200 ng, 20 ng, 2 ng, 0,2 ng und 0,02 ng) der Tumor-RNA zu Patient Nummer 28 zum Einsatz. Auch diese zeigten durchweg ein Signal. Die NTC blieb negativ.

4.5.2 TS-PCR Patient Nummer 33

Analog Kapitel 4.5.1 wurden auch präoperative Abstriche von Patient Nummer 33 in einer TS-PCR mit anschließendem Southern Blot und Oligohybridisierung untersucht. Ergebnisse sind in den Abb. 23 und 24 dargestellt. Als Positivkontrolle kommt erneut eine Verdünnungsreihe der Tumor-RNA zum Einsatz, die Negativkontrollen gleichen denen in Kapitel 4.5.1.

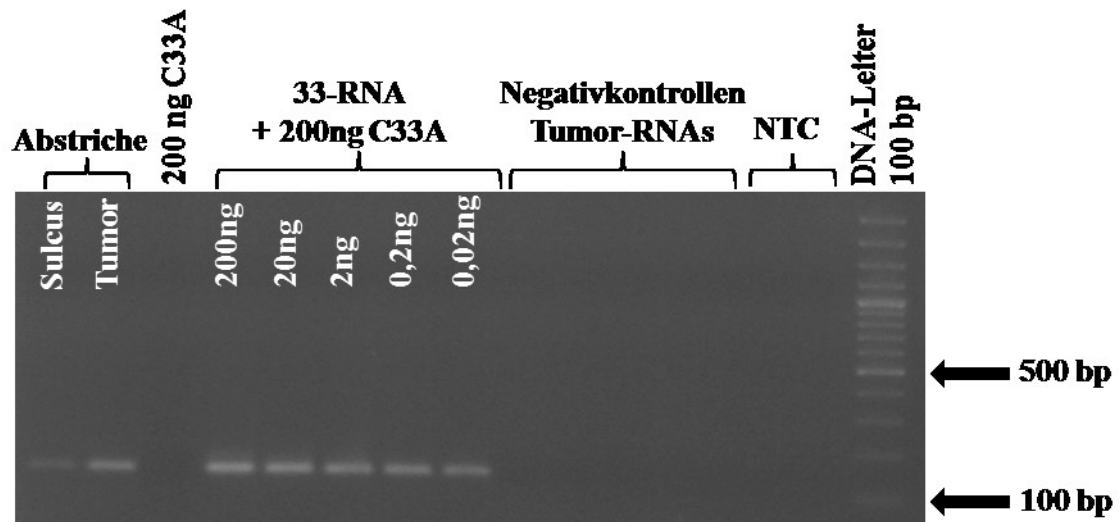


Abb. 23: Ergebnis der TS-PCR an präoperativen Abstrichen Patient Nummer 33 in der Gelelektrophorese

Beide präoperative Abstriche zeigen ein Signal und werden damit als positiv gewertet. Ebenso positiv sind die Verdünnungsstufen der Tumor-RNA, Negativkontrollen sind negativ. Erneut bestätigt Southern Blot und Oligohybridisierung dieses Ergebnis.

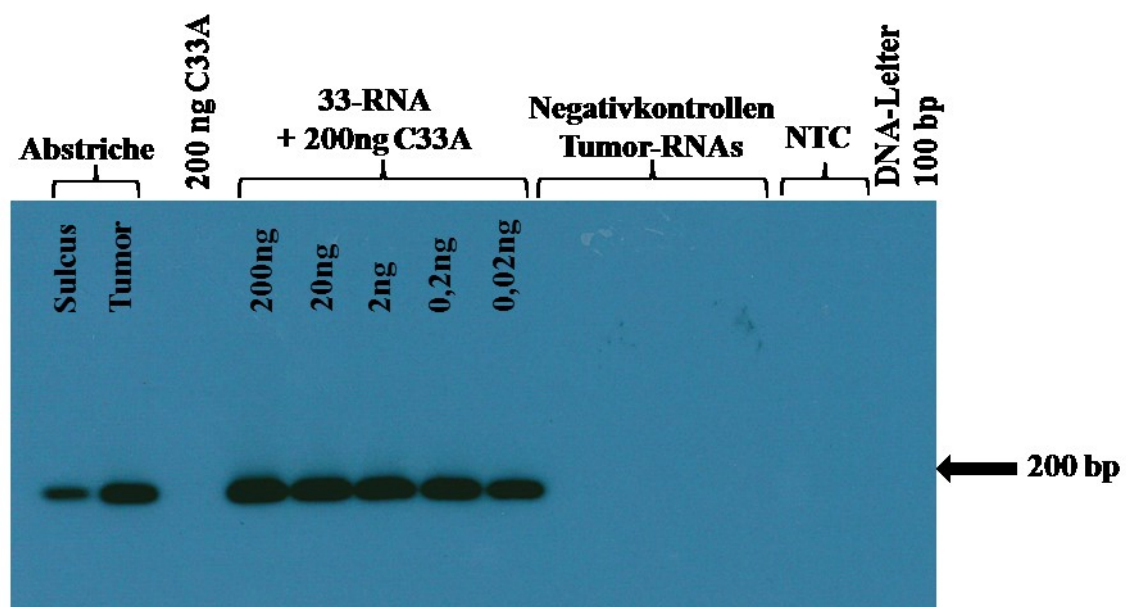


Abb. 24: Ergebnis der TS-PCR an präoperativen Abstrichen Patient Nummer 33 nach Southern Blot und Oligohybridisierung

Die β -Aktin-PCR zeigte sich für beide präoperativen Abstriche positiv (Abb. 25).

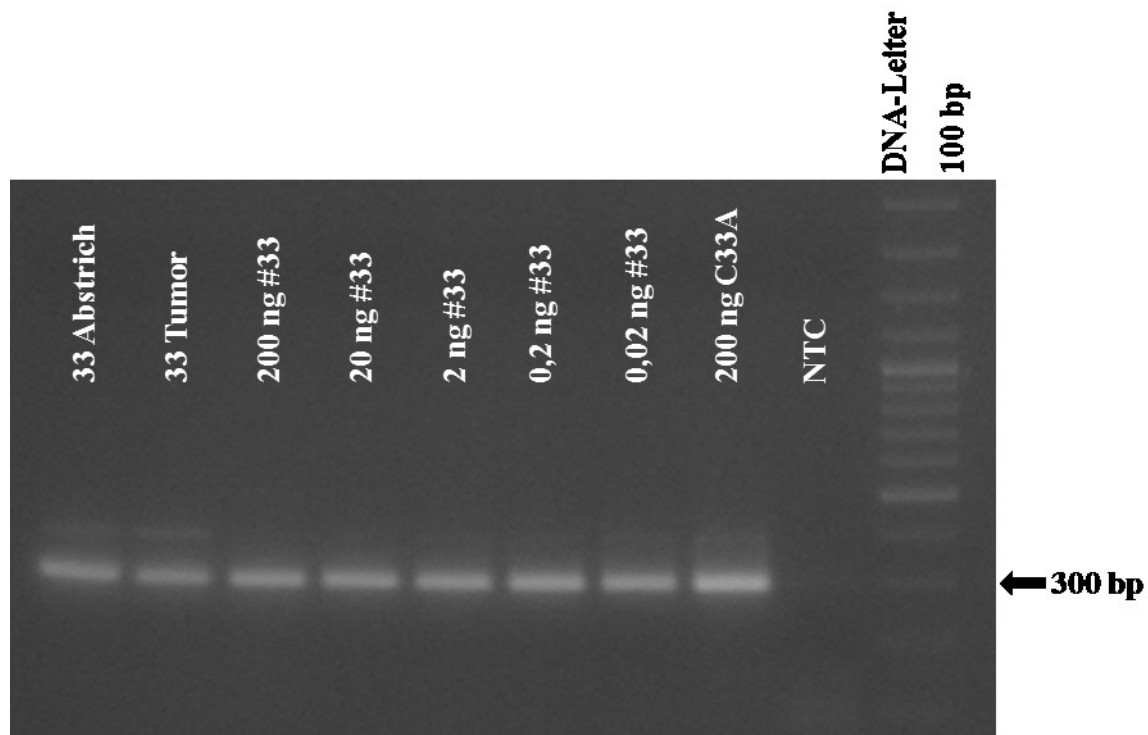


Abb. 25: β -Aktin-PCR der präoperativen Abstriche

4.6 TS-PCR an RNA der postoperativen Abstriche und Blutproben

Für beide Patienten (Nummer 28 und 33) wurden postoperative Probensets bestehend aus Abstrichen des Sulcus glossoalveolaris und der Stelle des Primärtumors sowie EDTA-Blut gesammelt. Bei Patient Nummer 28 wurden zwei Probensets jeweils 6 bzw. 13 Monate nach Operation, bei Patient Nummer 33 wurden drei Probensets jeweils 5, 12 bzw. 21 Monate nach Operation akquiriert.

An aus diesen Proben gewonnener RNA wurde die TS-PCR durchgeführt. Hierbei blieben postoperative Proben beider Patienten durchgehend negativ.

Die Ergebnisse für das letzte untersuchte Probenset von Patient Nummer 28 (13 Monate postoperativ) sind in Abb. 26 dargestellt. Gut erkennen kann man ein Signal in den Verdünnungsstufen der RNA aus der Tumorbiopsie. Material aus den postoperativen Abstrichen sowie der Blutprobe hingegen bleiben negativ, genauso wie die NTC. Bei der

Negativkontrolle handelt es sich um einen HPV-positiven Tumor ohne viral-zelluläres Fusionstranskript.

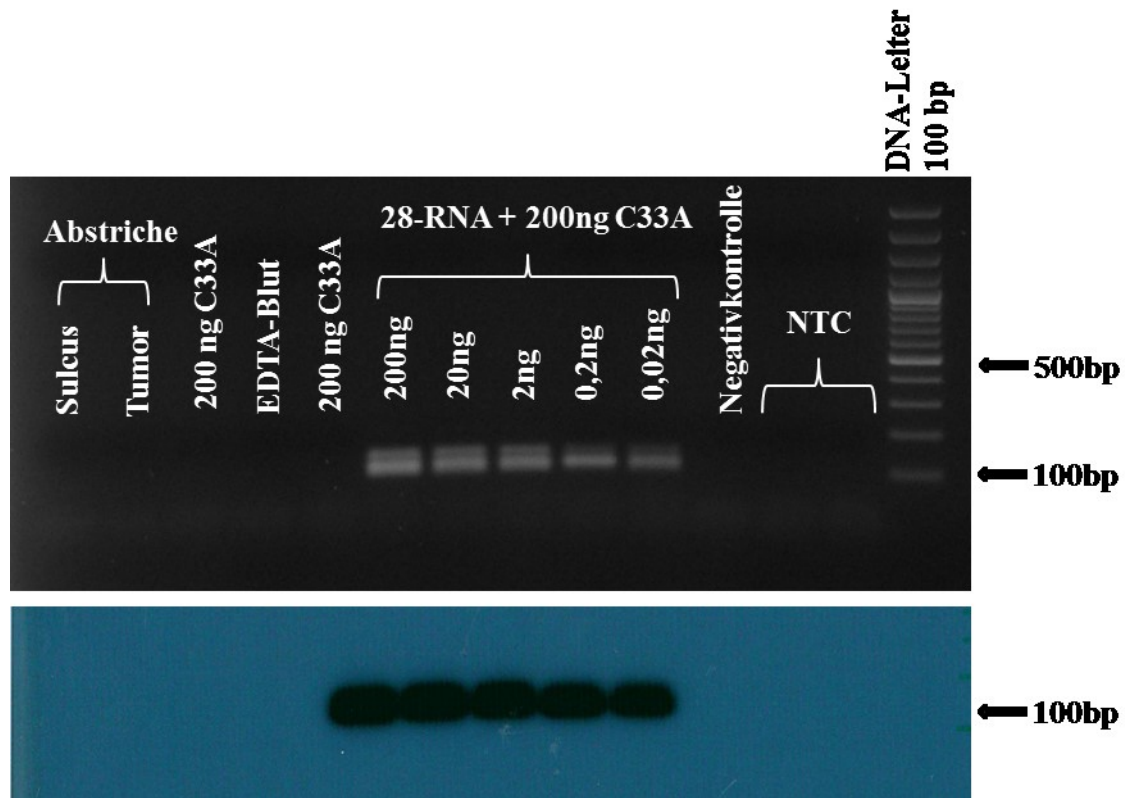


Abb. 26: Ergebnis der TS-PCR an postoperativen Abstrichen und Blutprobe Patient Nummer 28 in der Gelelektrophorese und nach Southern Blot und Oligohybridisierung

In Abb. 27 sieht man die Ergebnisse der TS-PCR an einem postoperativen Probenet von Patient Nummer 33 (21 Monate postoperativ). Auch hier konnten positive Signale nur in den Proben der verdünnten RNA der Tumorbiopsie nachgewiesen werden. Negativkontrollen blieben negativ, ebenso die postoperativen Abstriche sowie Blutprobe.

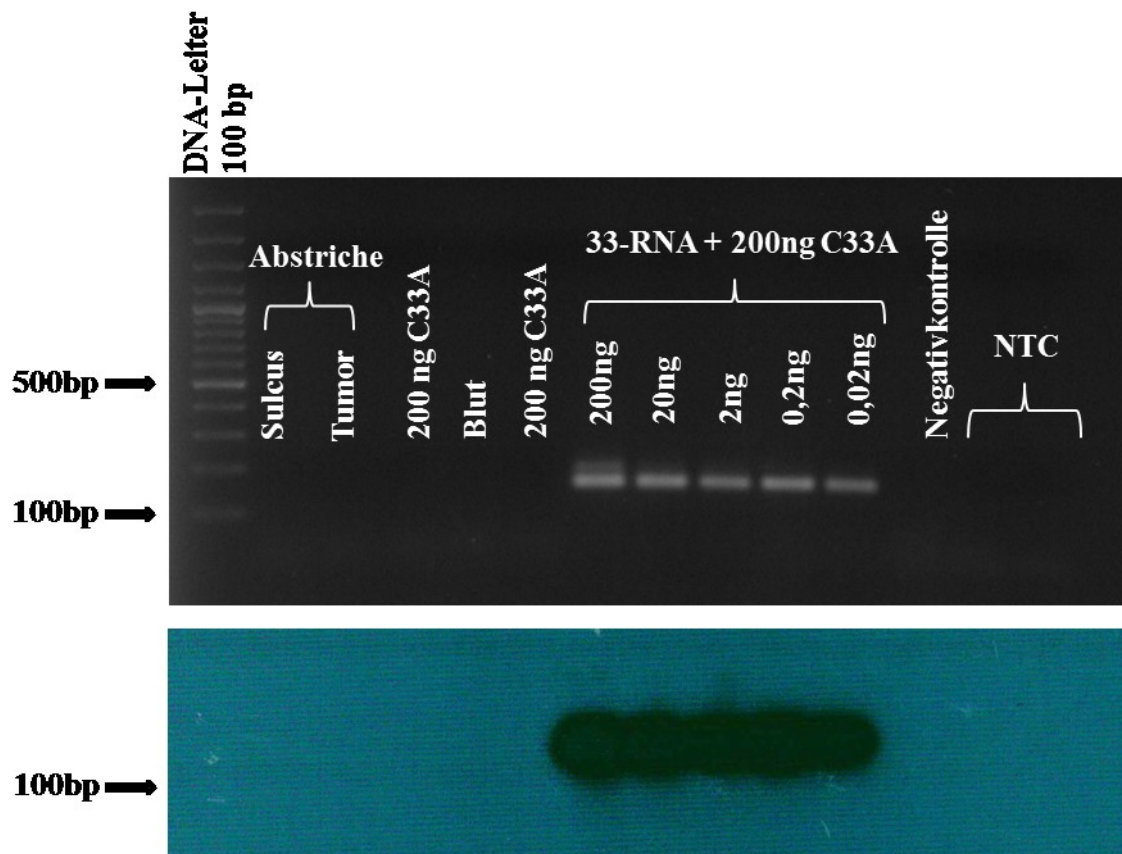


Abb. 27: Ergebnis der TS-PCR an postoperativen Abstrichen und Blutprobe Patient Nummer 33 in der Gelelektrophorese und nach Southern Blot und Oligohybridisierung

Selbstverständlich wurden alle postoperativen Proben in einer β -Aktin-PCR untersucht (ohne Bild). Hierbei zeigten sich Signale in allen Proben.

4.7 Ergebnisse der HPV 16-PCR

Die zusätzlich mit der cDNA aller Tumore durchgeführte HPV 16-PCR entsprach zu 100% dem Ergebnis der APOT-PCR. Waren die Proben in der APOT-PCR positiv, so zeigten sie auch eine Bande in der HPV 16-PCR. Umgekehrt gab es keine Signale in der HPV 16-PCR, wenn die Proben in der APOT-PCR negativ gewesen waren. Das heißt, dass auch in dieser Versuchsreihe nur 9 der 38 Tumorbiospien als positiv für HPV 16 getestet wurden. Das Ergebnis ist exemplarisch in Abb. 28 dargestellt. Man kann hier ein positives Signal bei Patient Nummer 21 sehen. Ebenso positiv sind die Kontrollen SiHa und CaSki.

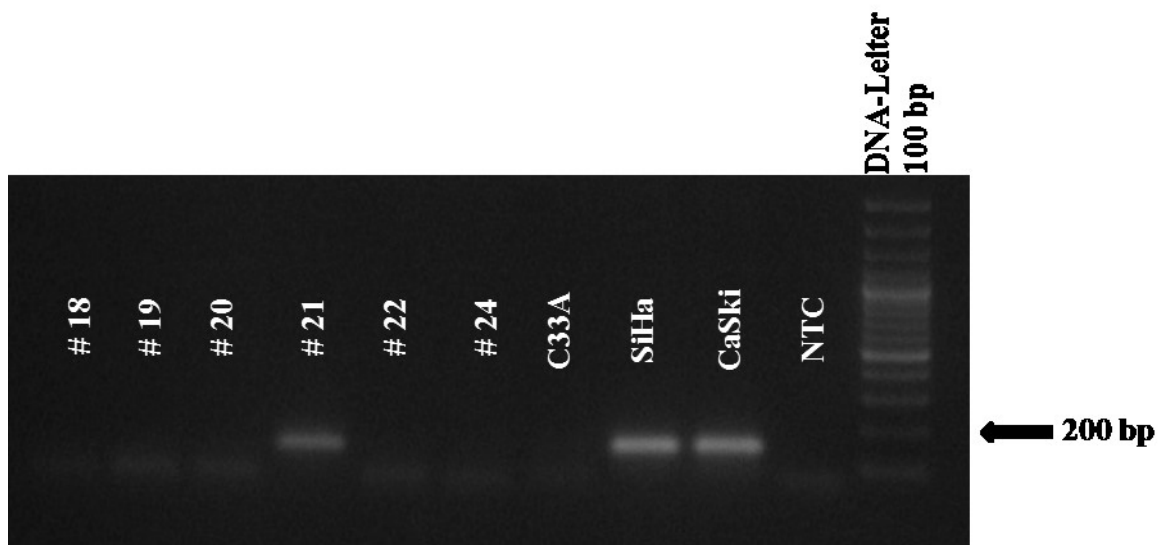


Abb. 28: Exemplarische Darstellung einer HPV 16-PCR im Gelelektrophoresebild.

Die Tumorstadien bei HPV 16-positiven Patienten und HPV 16-negativen Patienten sind in Tabelle 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 9: T- bzw. N-Stadium der HPV-positiven Tumoren

	N0	N1	N2	N3	gesamt
T1	0	0	1	0	1
T2	0	2	6	0	8
T3	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0
gesamt	0	2	7	0	9

Ein Tumor mit detektiertem HPV hatte den Differenzierungsgrad G1, zwei Tumore G2 und sechs Tumore G3. G1 bezeichnet gut differenziertes malignes Gewebe („low-grade“), G3 schlecht differenziertes malignes Gewebe.

Tabelle 10: T- bzw. N-Stadium der HPV-negativen Tumore (exklusive der Lymphome, inklusive Patient Nummer 5)

	N0	N1	N2	N3	gesamt
T1	1	0	3	2	6
T2	2	2	5	0	9
T3	1	1	3	0	5
T4	4	0	6	0	10
gesamt	8	3	16	2	30

Ein Tumor der HPV-negativen Biospien hatte den Differenzierungsgrad 1, zehn Tumore G2 und 11 Tumor G3.

4.8 Screening aller präoperativen Abstriche

Alle präoperativen Abstriche wurden in einer HPV 16-PCR untersucht. Ausgenommen wurden Abstriche der Patienten Nummer 28 und 33. Diese waren bereits umfassend untersucht (siehe 4.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Ergebnisse der APOT-PCR im Vergleich mit der HPV 16-PCR an präoperativen Abstrichen

Patient Nummer	APOT-PCR	präoperativer Abstrich	
		Sulcus	Primärtumor
1	-	kein Material	-
2	-	+	-
3	-	kein Material	+
4	-	-	+
5	kein Material	kein Material	+
6	-	kein Material	-
7	-	-	β-Aktin-PCR neg.
8	-	β-Aktin-PCR neg.	-
9	-	-	-
10	-	-	+
11	-	-	-
12	+	+	+

Patient Nummer	APOT-PCR (Tumorbiopsie)	präoperativer Abstrich	
		Sulcus	Primärtumor
13	Lymphom	-	-
14	-	+	+
15	Lymphom	-	-
16	-	-	-
17	+	+	+
18	-	-	kein Material
19	Lymphom	-	-
20	-	-	-
21	+	+	+
22	-	+	+
23	+	-	-
24	-	+	+
25	-	+	-
26	-	+	β-Aktin-PCR neg.
27	-	+	-
28	+	+	+
29	-	+	-
30	-	+	+
31	+	+	+
32	+	+	+
33	+	+	+
34	-	-	β-Aktin-PCR neg.
35	-	-	-
36	-	+	+
37	-	-	-
38	-	+	-
39	-	+	+
40	+	+	+
41	-	-	-
42	-	-	β-Aktin-PCR neg.

Die HPV-positiven Proben sind blau unterlegt. Bei unvollständigen Probensets ist dies in der Tabelle an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

Alle Abstriche wurden in einer β -Aktin-PCR auf Vorhandensein von RNA untersucht. Sollte eine Probe ein unzureichendes Signal gezeigt haben, so ist dies in der Tabelle vermerkt.

Die Lymphom-Patienten waren negativ. Da es sich hierbei um eine gänzlich andere Tumorentität handelt, werden diese Proben in den folgenden Auswertungen nicht mit berechnet. Da Patient Nummer 5 zwar durch eine fehlende Biopsie in der APOT-PCR nicht untersucht werden konnte, histologisch allerdings ein Plattenepithelkarzinom aufwies, wurde auch dieser in die folgende Auswertung mit einbezogen. 24 von 39 Patienten (61,5 %) zeigten mindestens einen positiven präoperativen Abstrich.

Bis auf Patient Nummer 23 zeigten alle in der APOT-PCR positiven Patienten auch einen positiven Befund der Abstriche. 16 Patienten mit HPV-negativen Tumorbiopsien zeigten sich in einem der beiden präoperativen Abstriche HPV-positiv.

Zusammenfassend konnte in 25 von 39 (64 %) vorliegenden Plattenepithelkarzinomen HPV 16 RNA im Tumor und/oder präoperativen Abstrich detektiert werden.

5. Diskussion

5.1 Konservierung und Aufbereitung des Probenmaterials

Die Proben wurden aus insgesamt 6 Zentren für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde gesammelt, um eine möglichst große Anzahl an Proben zu akquirieren.

Da es sich bei RNA um ein äußerst instabiles Molekül handelt, musste für den Transport RNAlater verwendet werden, um diese zu stabilisieren und so die Isolation der RNA zu ermöglichen. Schnitte der Tumorbiopsien konnten nicht mehr angefertigt werden, da RNAlater die Struktur der Gewebe zerstört.

Eine Untersuchung, ob im zugesendeten Material tatsächlich Tumorzellen vorhanden waren oder ob es sich lediglich um Bindegewebe aus der Tumorumgebung oder tumorfreies Organgewebe handelte, war daher nicht möglich. Dies ist eine Schwäche der Versuchsreihe. Rein makroskopisch sind die Grenzen zwischen unauffälligen und auffälligen Gewebe nicht hundertprozentig abgrenzbar.

Die aus den Proben (Biopsien) isolierte RNA wurde spektrophotometrisch vermessen. Erfasst wurde die RNA-Menge aber auch Werte, die einen Hinweis auf die Qualität des Materials geben können. Fast alle Proben wiesen hierbei einen ausreichenden Gehalt an RNA in guter Qualität aus. Ausnahmen sind im Teil Ergebnisse beschrieben. Allerdings gibt das keinen Rückschluss, ob es sich um Tumor-RNA oder „gesunde“ RNA einer Körperzelle handelt. Für alle Proben, auch die Abstriche, wurden β -Aktin-PCRs durchgeführt, sie geben eine Information über die Güte und Menge der isolierten RNA, nicht jedoch über dessen Ursprung.

Die Methodik der Aufbewahrung der Biopsien und Abstrichmaterialien sowie die Aufbereitung dieser war eine im Labor bereits etablierte Methode. Es wurden umfangreiche Messungen und Tests im Hinblick auf RNA-Qualität und Erhalt dieser durchgeführt (Schumann 2012). Die Tatsache, dass RNA mit einer Ausnahme in allen Tumorbiopsien nachweisbar war spricht dafür, dass ein RNA-Verlust von Entnahme der Probe bis hin zu deren Aufbereitung unwahrscheinlich ist. Bei der genannten Ausnahme handelt es sich um eine Tumorbiopsie (Patient Nummer 26), welche nach Entnahme versehentlich in Formalin gelagert wurde. Einige präoperative Abstriche zeigten kein Signal in der β -Aktin-PCR. Das Problem liegt wahrscheinlich weniger in der Methodik als vielmehr an der Entnahmeart welche zu nur wenigen Zellen im Abstrich führten.

5.2 Prävalenz von HPV Typ 16 im untersuchten Probenmaterial

38 Patienten mit einem histologisch gesichertem Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (Oropharyngeal squamous cell carcinoma, OSCC) wurden im Rahmen dieser Arbeit mit der APOT-PCR auf den HPV-Status untersucht. 9 Patienten wiesen HPV 16 auf und in 2 Proben konnte ein viral-zelluläres Fusionstranskript nachgewiesen werden.

Die aus Tumor-RNA abgeleitete cDNA wurde außerdem in einer Kontroll-PCR auf HPV 16 getestet. Auch hierbei waren 9 der 38 Proben positiv. Es handelte sich dabei um dieselben Patientenproben. In zwei unterschiedlichen Methoden bestand also eine hundertprozentige Übereinstimmung.

Die Rate an HPV 16-positiven OSCC beträgt somit 23,68% und ist entgegen der Erwartungen niedrig. In der Literatur sind unterschiedliche Prävalenzen von HPV 16 in HNSCC beschrieben. So liegt diese bei Herrero et al. mit 25 % relativ niedrig (Herrero et al. 2003). Es handelt es sich dabei allerdings um die Minderheit. Chaturvedi et al. beschreiben sogar einen Trend, in welchem zunehmend HPV, vor allem Typ 16, als Ursache für HNSCC in Frage zu kommen (Chaturvedi et al. 2011). In anderen Studien wurden HPV-DNA-Detektionsraten bis zu 85% beschrieben (Nasman et al. 2009). In einer aktuellen Studie liegt die Rate an positiven Tumoren zum Beispiel je nach Methode bei 52 bzw. 56 % (Vojtechova et al. 2016). Insgesamt wurde also durchaus eine höhere Prävalenz im Rahmen dieses Projektes erwartet und die niedrigen Zahlen waren überraschend.

Faktoren, welche bei der Diskussion über Prävalenz von HPV-positiven oropharyngealen Tumoren einbezogen werden müssen, sind die Detektionsmethode, das Probenmaterial sowie regionale Unterschiede in den Detektionsraten (Simard et al. 2014).

Die Methoden, mit denen oben genannte Prävalenzen ermittelt wurden unterscheiden sich im Ausgangsmaterial (zumeist DNA) und in der Durchführung. Es gibt also keine Standardmethode, sondern verschiedene Ansätze zum Nachweis von HPV. Meistens handelte es sich in den oben genannten Studien um den Nachweis von HPV DNA (Herrero et al. 2003, Nasman et al. 2009). DNA ist ein stabileres Molekül als RNA, auf der anderen Seite war RNA aus fast allen Proben extrahierbar (siehe 4.2.1). Es ist also gut möglich, mit RNA zu arbeiten. Eine Detektion von RNA (vor allem mit Primern im E6/E1 Bereich) setzen ein aktives HPV im nicht-replizierenden Stadium voraus, in der Regel ein Zeichen für eine transformierende HPV Infektion und keine Transiente. Der Einsatz von APOT-PCR bei Tonsillenkarzinomen wurde bislang nur wenig beschrieben (zum Beispiel Vojtechova et al. 2016, Olthof et al. 2014).

Gegen regionale Unterschiede als Ursache für die niedrige Prävalenz spricht eine Veröffentlichung von 2009: eine in Jena, Thüringen durchgeführte Studie gab eine Detektionsrate von 75% an (Glombitza et al. 2010).

Ein Nachteil ist die Unklarheit über das eingesetzte Gewebe und damit die Probenqualität (siehe 5.1). Auch hier kann die Ursache für die niedrige Prävalenz gesucht werden. Wie dort beschrieben, konnten keine Gewebeschnitte angefertigt werden. Bei Nasman et al. 2009 zum Beispiel waren 70% Tumorzellen in den Paraffinschnitten überhaupt erst Voraussetzung, um eine Biopsie in die Studie einzuschließen.

Auch wenn HPV 16 der dominante Typ in OSCC ist, kommt es in seltenen Fällen auch zur Infektion mit andere Hochrisiko-Typen von HPV (18, 33, 35 oder 45) (Hammarstedt et al. 2006, Smith et al. 2004). Sicherlich wäre es interessant, zukünftige Proben auch auf diese Typen zu untersuchen. Auf das Ergebnis dieser Arbeit hätte dies einen eher geringen Einfluss gehabt. HPV 16 ist in allen Studien der vorherrschende Typ, welcher mit dem Vorliegen eines Tonsillenkarzinomes oder eines OSCC korreliert (zum Beispiel Chaturvedi et al. 2011).

Die geringe Prävalenz ist ein Schwachpunkt für die folgenden Teile der Arbeit – mehr Tumore, welche ein viral-zelluläres Fusionstranskript aufweisen, würden die Arbeitshypothese stärker untermauern. Da es aber nicht per se um eine Untersuchung der Detektionsrate von HPV 16 in Tonsillenkarzinomen geht, spielt die Prävalenz für das eigentliche Ziel dieser „Proof-of-principle“-Studie keine entscheidende Rolle.

Die Untersuchung auf HPV 16 wurde für jede Probe jeweils zweimal von unabhängigen Personen durchgeführt, um einen Untersucherfehler auszuschließen. Dabei kam es zu identischen Ergebnissen.

5.2.1 Untersuchung der präoperativen Abstriche auf HPV 16

Auf Grund der niedrigen Anzahl HPV-positiver Tumorproben wurde eine HPV 16 spezifische one-step-PCR mit RNA aus allen präoperativen Abstrichen durchgeführt. Untersucht wurden auch Abstriche, in deren dazugehöriger Tumorbiopsie kein HPV 16 detektierbar war.

Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Positivität. So waren 61,5 % aller Patienten in mindestens einem der beiden präoperativen Abstriche HPV-positiv. Die Positivität war damit in den Abstrichen höher als die Anzahl positiver Tumorbiopsien (23,68 % in Tumorbiopsien vs. 61,5 % in den Abstrichen). Bei 16 Patienten (41 %) konnte man eine HPV-Infektion nur in einem oder beiden Abstrichen nachweisen, nicht jedoch in

der Tumorbiopsie. Insgesamt konnte bei 64 % der Patienten HPV 16 entweder in einem der Abstrichen und/oder der Tumorbiopsie nachgewiesen werden.

Das Vorliegen genetischen Materials von HPV 16 stellt per se kein Hinweis auf einen Zusammenhang mit einem Karzinom dar. Eine Infektion mit HPV ist prinzipiell auch beim gesunden Menschen möglich bzw. nicht alle Patienten mit einer HPV Infektion müssen auch ein Karzinom entwickeln. Gerade in den Abstrichmaterialien könnte auch Material vorhanden sein, welches nicht vom Tumor selbst stammt. Somit würde hier unter Umständen eine HPV Infektion parallel zum Tumorgeschehen vorliegen.

Eher gegen dieses Argument sprächen allerdings Zahlen diverser Veröffentlichungen. In verschiedenen Untersuchungen wurden gesunde Menschen auf einen oral oder oropharyngeal detektierbaren HPV untersucht. Die Positivitätsrate stellte sich dabei als eher gering heraus und belief sich zwischen 4,4 % und 7 % (Kreimer et al. 2013, Gillison et al. 2012). Der häufigste Typ bei einer Infektion im Mund-Rachen-Bereich bei gesunden Probanden ist HPV 16. Die Prävalenz liegt bei etwa 1% (3,7 % für alle HR-HPV) (Gillison et al. 2012).

Eine Infektion mit HPV geht nicht zwangsläufig in ein Karzinom über. So wurde in Untersuchungen gezeigt, dass für High Risk HPV (HR HPV) zwar ein längerer Zeitraum zur Eliminierung durch das Immunsystem benötigt wird. Aber nicht alle Infektionen persistieren auch und führen zur malignen Entartung von Epithelzellen (Ho et al. 1998). Man kann davon ausgehen, dass nicht jeder gesunde Mensch, der in seinem Leben eine Ansteckung mit HPV hat, auch eine maligne Entartung entwickelt.

Es ist in Anbetracht dieser Daten sehr unwahrscheinlich, dass 41,5 % der Patienten zufällig eine HPV-Koinfektion bei bekanntem OSCC aufweisen. Daher kann es sein, dass einige Gewebe keine Tumorzellen enthielten und somit nicht HPV-positiv waren (siehe 5.1). Interessant wäre in diesem Hinblick die Untersuchung auf HPV der Paraffinblöcke der Tumore.

5.3 Ergebnisse der APOT-PCR

Die Integrationsrate der HPV-positiven Tumorproben beläuft sich auf 2 von 9 Proben (22,2 %). Studien zur Integration des HPV-Genoms bei Tonsillenkarcinomen, OSSC und HNSCC sind vorhanden, jedoch unterscheiden sich die angewandten Methoden und Ergebnisse teils deutlich. Sie sind längst nicht so zahlreich wie bei Zervixkarzinomen. Dort wurde das Integrationsverhalten von HPV bereits ausführlich untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich für die Methodik der APOT-PCR (Amplification of Papillomavirus Transcripts-PCR) entschieden. Diese Methodik wurde von Klaes et al. 1999 etabliert, um anhand von genetischen Materials aus Zervixdysplasien und –karzinomen zwischen Transkripten abgeleitet von episomaler und integrierter HPV-DNA zu unterscheiden (Klaes et al. 1999). Es handelt sich dabei um eine äußerst sensitive Methodik. Ausgangsmaterial für die APOT-PCR ist RNA des Tumorgewebes. Damit unterscheidet sie sich von der DIPS-PCR (Detection of Integrated Papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR), welche ebenso Integrationsloki detektieren kann, aber mit genomischer DNA arbeitet (Luft et al. 2001).

Weitere Untersuchungen mit Hilfe der APOT-PCR zu nicht-Zervixkarzinomen umfassten zum Beispiel auch Versuche zu anogenitalen Tumoren (zum Beispiel Das et al. 2012, Ziegert et al. 2003), der juvenilen laryngealen Papillomatosis (Huebbers et al. 2013) und odontogenen Tumoren (Hirayama et al. 2010).

In Bezug auf Tumore des Oropharynx, speziell der Tonsillenkarzinome, wird die APOT-PCR nicht häufig angewandt. Aber auch hier wurde sie bereits erfolgreich eingesetzt, um Integrationshäufigkeit und Integrationsloki zu bestimmen (Vojtechova et al. 2016, Olthof et al. 2014, Lace et al. 2011, Wiest et al. 2002). Ergebnisse wie auch Patientenzahlen unterscheiden sich hierbei allerdings von Studie zu Studie. Des Weiteren wurden von vornherein in den meisten Experimenten nur HPV 16-positive Tumore untersucht. Darin liegt ein großer Unterschied zu diesem Projekt. Wir untersuchten mittels APOT-PCR alle vorliegenden OSCC. Der APOT-PCR wurde keine HPV 16-PCR vorgeschaltet. Stattdessen versuchten wir, zwei Schritte in einer PCR durchzuführen.

Mit der größten Patientenzahl von 75 konnten Olthof et al. eine Rate von viral-zellulären Fusionstranskripten in 39 % zeigen. Lace et al. hingegen zeigten eine Integration von HPV 16 in 6 von 9 Fällen, wohingegen Wiest et al. nur bei 2 von 7 vorausgewählten Tumoren ein Fusionstranskript auffinden konnten. Vojtechova et al. verglichen unterschiedliche Methoden zur Feststellung des Status von HPV in Tumorgewebe. Hier liegen in 43 % aller mit APOT-PCR untersuchten Fälle Virusintegrate vor. Auf Grund der mitunter ebenfalls sehr kleinen Fallzahlen der Untersuchungen ist es schwer, einen Trend festzusetzen, welcher die Häufigkeit der Integration beschreibt.

Alle oben genannten Studien führten eine APOT-PCR zur Bestimmung der Häufigkeit der Integration oder zur Untersuchung der Integrationsloki durch. Eine Validierung, zum Beispiel mittels TS-PCR wie in dieser Arbeit, wurde nicht durchgeführt.

In verschiedenen Publikationen wurde der Status des Virus mit Hilfe anderer Methoden oder anhand von DNA statt RNA untersucht. Die Integrationsraten reichen dabei von 15 % bis 42 % (Gao et al. 2014, Mooren et al. 2013).

Insgesamt scheint die Integrationsrate in OSCC und Tonsillenkarcinomen generell niedriger zu sein als in Zervixkarzinomen. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit denen anderer Gruppen in dieser Hinsicht überein. Es wurden allerdings nur 9 HPV-positive Tumore auf Integration hin untersucht. Dies ist eine sehr kleine Zahl und damit nicht verallgemeinerbar.

Die Rolle der Integration des Virusgenoms in das zelluläre Genom im Zusammenhang mit der Karzinogenese ist bis heute nicht eindeutig geklärt. An Zervixkarzinomen ist sie noch am besten untersucht. Bekannt ist, dass die Rate an Integraten mit Zunahme der Dysplasiestufe beim Zervixkarzinom zunimmt (Klaes et al. 1999). Vor allem HPV 18 liegt in bis zu 92 % als Integrat vor, bei HPV 16 sind es immerhin noch von 55 % (Vinokurova et al. 2008). Integration scheint allerdings nicht per se zu erhöhter Expression der Onkogene E6 und E7 zu führen (Hafner et al. 2008, Olthof et al. 2014). Es ist also möglich, dass die Integration eine treibende, aber keine entscheidende Kraft in der Karzinogenese ist. Im Rückschluss kann nicht davon ausgegangen werden, dass ein HPV-positives Tonsillenkarcinom auch ein Fusionstranskript enthält. Erschwerend kommt hinzu, dass im Gegensatz zum Zervixkarzinom die Karzinogenese bei den OSCC noch größtenteils unbekannt ist.

Neben der APOT-PCR gibt es weitere Möglichkeiten, den Integrationsstatus von HPV in einer Karzinomzelle festzustellen. Je nach Methodik kann dabei auf DNA oder RNA zurückgegriffen werden.

Ein Beispiel wäre die oben genannte DIPS-Methodik, welche mit DNA arbeitet (Luft et al. 2001). Die Integration wird hierbei vor dem Schritt der Transkription und des Splicing dargestellt. Die DIPS-PCR arbeitet zwar mit DNA und damit mit einem stabileren Molekül. Allerdings ist die Methodik komplizierter und arbeitsaufwendiger als die APOT-PCR. Des Weiteren kann man keine Aussage treffen, ob es sich um ein stilles oder aktives Integrat handelt. Auch beim TEN16-Assay wird mit DNA gearbeitet (Xu et al. 2013). Integrationsassays mittels FISH wurden ebenfalls bereits beschrieben (Ragin et al. 2004). Neben der APOT-PCR gibt es zum Beispiel noch eine Methodik, welche RNA von E6 im Verhältnis zu E2 darstellt und daraus Schlüsse auf den Status von HPV zieht (Vojtechova et al. 2015).

Die unterschiedlichen Methoden wurden in der Literatur mitunter verglichen, die Ergebnisse differieren dabei allerdings. In einigen Studien zeigte sich die APOT-PCR in der Detektionsrate anderen Methoden gegenüber weniger sensitiv, zum Beispiel dem TEN16-Assay bei Xu et al. So wurden hier auf DNA-Ebene mehr Integrate detektiert als auf RNA-Ebene. Das liegt zum einen daran, dass transkriptionell-stumme Integrate in einer APOT-PCR nicht dargestellt werden können. Auf RNA-Ebene werden nur transkriptionell aktive Integrate sichtbar.

Auch bei Ziegert et al. konnten einige der in einer DIPS-PCR dargestellten viral-zelluläre Fusionstranskripte nicht durch die APOT-PCR bestätigt werden. Zum einen wurde das mit einem fehlenden bzw. abnormen Spleißprozess begründet. Dies würde ein Produkt bedeuten, welches zu lang ist, um via APOT-PCR detektiert zu werden. Auch die These des Vorliegens übermäßig vieler episomal abgeleiteter Transkripte, welche die Integrat-abgeleiteten Transkripte überdecken, wird hierbei ins Feld geführt.

Die meisten viral-zellulären Übergänge als Zeichen einer Integration wurden detektiert, sobald mehrere Methoden eingesetzt und kombiniert wurden, zum Beispiel DIPS- und APOT-PCR bei Olthuf et al.

Zusammenfassend gibt es mehrere Punkte, welche bei der Arbeit mit der APOT-PCR beachtet werden müssen.

Zum einen das verwendete Material. RNA ist ein instabiles Molekül. Durch den RNAlater können keine Schnitte angefertigt werden. Eine Evaluation des Materials ist unmöglich. Zweitens kann es im Prozess der Transkription von DNA zu mRNA es zu „Verlusten“ kommen, in dem Sinne, dass Integrate im Spleißprozess nicht zu mRNA umgeschrieben werden und somit verändert oder transkriptionell-stumm sind. Diese sind nicht durch die APOT-PCR detektierbar, da sie nur aktive Integrate darstellen kann. Wobei unklar ist, ob es sich dabei um einen Vor- oder Nachteil handelt, denn welche Rolle Integrate in der Karzinogenese spielen und ob sie überhaupt eine treibende Kraft darstellen, ist bis heute nicht im Detail geklärt. Durch die oben genannten Veränderungen kann ein genauer Integrationslokus mitunter nicht bestimmt werden. Zudem können Produkte der APOT-PCR die typische Länge eines episomal-abgeleiteten Transkriptes aufweisen. Eine Sequenzierung aller Produkte ist daher unbedingt nötig, um den Status von HPV zu erhalten. So hatte im Rahmen dieser Arbeit zum Beispiel Tumorprobe 28 die typische Länge für episomal-abgeleitete Transkripte, stellte sich aber als viral-zelluläres Transkript heraus. Darüber hinaus kann das Vorliegen vieler episomaler Transkripte Integrate verschleiern. Auch zu lange Integrate können durch die APOT-PCR nicht erfasst werden.

Auf der anderen Seite handelt es sich um eine äußerst sensitive und relativ einfach durchzuführende Methodik. Auf Grund der parallel durchgeführten HPV 16- PCR an der Tumor-RNA wurde ausgeschlossen, dass Tumore in der APOT-PCR falsch-negativ waren. Rückblickend ist dies also nicht für die niedrige Prävalenz an HPV (siehe 5.2) verantwortlich.

Interessant wäre es, die zu den Patientenproben zugehörige DNA auf HPV-Rate und – Status zu überprüfen und mit den Ergebnissen zu vergleichen.

5.4 Ergebnisse der Tumor-spezifischen PCR

5.4.1 Spezifität und Sensitivität der tumorspezifischen PCR

Die Vorversuche mit genetischem Material aus Zelllinien zeigten, dass es sich bei der Tumorspezifischen-PCR (TS-PCR) um eine Methodik hoher Sensitivität handelt. Es gelang der Nachweis von 10 pg RNA der HPV 16-infizierten Krebszellen mit einem Hintergrund von 200 ng RNA nicht-infizierten Zellen. Wenn man von einem durchschnittlichen RNA-Gehalt von 20 pg pro Zelle ausgeht (laut Lehrbuch kann man von 10-30 pg pro Zelle ausgehen), ist das eine Zelle vor einem Hintergrund von 10.000 Zellen. Das heißt: das Äquivalent an RNA einer HPV 16-positiven Tumorzelle ist vor dem Hintergrund von RNA äquivalent zu 10.000 nicht HPV 16-positiven Zellen nachweisbar. Die Sensitivität ist sehr hoch und für dieses Projekt ausreichend.

Natürlich handelt es sich hierbei um ein theoretisches Modell. Es wurden keine einzelnen Zellen an sich eingesetzt, sondern von Zellen extrahiertes RNA-Material.

Obwohl der Schwerpunkt dieser Versuchsreihe auf der Sensitivität lag, zeigte sich hierbei auch die hohe Spezifität der Methodik auf Basis von tumorspezifischen Primern und Sonden. In der Gelelektrophorese waren Banden der erwarteten Produktgröße nur bei dem Zieltumor zu sehen. Eventuelle Banden in Negativkontrollen waren lediglich auf einer abweichenden Höhe zu finden. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um Artefakte und Primerdimere handelt, die bei einer PCR entstehen können. Durch die Oligohybridisierung konnten weitere Zweifel ausgeräumt werden: hier zeigten sich eindeutige Banden nur in den PCR-Produkten des Zieltumors. Es handelt sich also um eine spezifische PCR die nur die Zielprodukte darstellt. Dies wird durch den für jedes Fusionstranskript individuellen viral-zellulären Übergang zusätzlich gesichert.

Dass eine ausreichende Sensitivität und Spezifität vorlagen, zeigte sich im weiteren Verlauf bei den durchgeführten TS-PCR mit den Proben von Patientenummer 28 und 33 (siehe 5.4.2).

Zusammenfassend handelt es sich also um eine äußerst sensitive und spezifische Methodik.

5.4.2 Anwendung der TS-PCR an Patientenmaterial

Zwei Patientenproben konnten in der TS-PCR untersucht werden, da sie alle Kriterien erfüllten. Dies waren die beiden Tumorbiopsien, in denen durch die APOT-PCR ein viral-zelluläres Fusionstranskript nachgewiesen werden konnte. Tumormaterial konnte in der TS-PCR in den jeweiligen präoperativen Abstrichen der Patienten detektiert werden. In beiden Fällen (28 und 33) konnte das viral-zelluläre Fusionstranskript im Sulcusabstrich und im Tumorabstrich nachgewiesen werden. In den im jeweiligen Versuch mitgeführten Positivkontrollen (Verdünnungsreihe der Tumor-RNA bis auf 0,02 ng, also in etwa eine Zelle) konnte immer Material amplifiziert werden. Negativkontrollen hingegen blieben auch nach der Oligohybridisierung negativ.

Das eigentliche Ziel des Projektes wurde somit erreicht – durch etablierte individuelle, molekulare Marker konnten Tumorzellen außerhalb des Tumorverbandes in Abstrichmaterial detektiert werden. Dabei wurden nur Zellen des patientenspezifischen Tumors erfasst. Es handelt sich also wie oben diskutiert um eine hoch spezifische und sensitive Methode.

Wieviel Tumorzell-RNA in den Abstrichen enthalten war, ließ sich nicht sagen. Bei der TS-PCR handelt es sich um einen qualitativen und nicht um einen quantitativen Nachweis. „Positiv“ würde Rezidiv heißen, „Negativ“ Remission. Aktuell würde das heißen, dass nur R0-resizierte Patienten für die TS-PCR in Frage kommen würden. Möchte man auch inoperable Patienten mit einschließen, so muss zum Beispiel eine RT-PCR etabliert werden, in welcher die Quantifizierung der Marker möglich ist.

Die beiden Patienten, von denen das Tumormaterial stammte, wurden auch postoperativ regelmäßig untersucht. Hierbei wurden Abstriche zur weiteren Untersuchung in unserem Labor abgenommen. Diese blieben im Verlauf an mehreren Kontrollpunkten negativ.

Beide Patienten hatten bei Diagnose einen Tumor im Stadium T2. Wenn man den Angaben in der Literatur folgt, so ist bei ihnen von vornherein die Wahrscheinlichkeit eines lokal rezidivfreien 5-Jahres-Überlebens mit etwa 84 % recht hoch (Mendenhall et al. 2006). Beide Tumoren konnten R0 reseziert werden, weshalb keiner der beiden Patienten ein Lokalrezidiv im Zeitraum der Nachbeobachtung (für Patient Nummer 28 13 Monate, für Patient Nummer 33 21 Monate) durch dieses Projekt hatte. Während es bei Patient Nummer 33 auch kein Rezidiv in Form einer Fernmetastase gab, so wurde etwa 2 Jahre nach Diagnose des Primärtumors eine Lungenmetastase bei Patient Nummer 28 gefunden.

Dies würde gut auf die Stadien der Lymph- und Venengefäßinfiltration passen. Diese waren bei Nummer 28 L1 und V1, bei 33 L0 und V0. Gerade die Infiltration von Lymph- und Venengefäßen ist ein wichtiger Prognosefaktor für die Entwicklung eines Rezidivs (Rahmati et al. 2015). Dies passt auch zu deren Beobachtung, dass mehr als 50 % der Patienten mit Rezidiv statt eines Lokalrezidives eine Fernmetastase aufweisen.

Die Rate an Rezidiven scheint zusätzlich von anderen Faktoren abhängig zu sein. Unterscheiden sich die Zahlen in geringem Ausmaß bei verschiedenen Behandlungsmethoden, so ist der Trend doch immer gleich. Zu den beeinflussenden Faktoren gehören zum Beispiel das T-Stadium bei Diagnose, das Resektionsergebnis des Primärtumors, die Invasion der Lymphgefäße und der p16-Status (Mendenhall et al. 2006). Der Differenzierungsgrad des Tumors stellt einen weiteren Faktor dar (Rahmati et al. 2015). Interessanterweise beschreiben Rahmati et al. die Beobachtung, dass Patienten mit p16-positiven Tumoren eine besserer 5-Jahres-Überlebensrate und die Tendenz zu einer niedrigeren Rezidivrate haben, außerdem wiesen sie eine niedrigere Rate an Lymph- und Venengefäßinfiltration auf. p16-Positivität ist ein Hinweis auf HPV-Infektion. Paradoxerweise ist allerdings der Differenzierungsgrad bei HPV-positiven Tumoren schlechter als bei HPV-Negativen (Fakhry et al. 2008). HPV-positive Tumore unterscheiden sich von HPV-negativen Tumoren hinsichtlich weiterer Faktoren. So haben HPV-positive Tumore bei Diagnose häufig ein niedrigeres T-Stadium als HPV-negative Tumore (Ward et al. 2014). Es zeigte sich außerdem in mehreren Studien, dass HPV-positive Tumore eine bessere Prognose als HPV-negative Tumore haben. Das kann auf der einen Seite an jüngeren Patienten und einen gesünderen Lebensstil liegen. Zum anderen zeigte sich allerdings auch, dass weniger Mutationen in HPV-positiven Tumoren vorliegen (Agrawal et al. 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden das das Gesamtüberleben unter gleicher Therapie bei HPV-positiven Tumoren höher als bei HPV-negativen Tumoren ist (Ang et al. 2010).

Unter dem Aspekt der Möglichkeit der Bildung von Fernmetastasen in der Nachsorge wurden im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen Blutproben der beiden Tumorpatienten 28 und 33 untersucht. Dabei wurde eine von Pfitzner et al. etablierte Methodik verwendet (Pfitzner et al. 2014). Das Ziel war, zirkulierende Tumorzellen (CTC) zu detektieren, die ein Risiko für ein Rezidiv in Form einer Fernmetastase darstellen könnten.

Die sogenannten „liquid biopsies“ gewinnen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Dabei handelt es sich um zirkulierende Tumorzellen (CTC) oder zellfreie zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA). Sie sollen die Überwachung der Tumorpatienten

erleichtern und die Notwendigkeit invasiver Eingriffe minimieren. Bei einigen soliden Tumoren sind CTC und ctDNA bereits als prognostische Marker etabliert, zum Beispiel beim Mammakarzinom (Dawson et al. 2013). Bei HNSCC ist diese Methodik noch nicht etabliert, obwohl auch hierbei schon länger versucht wird, CTC im peripher venösen Blut nachzuweisen (reviewed in Mockelmann et al. 2014).

So scheint die Anzahl an detektierbaren CTCs im Verlauf der Therapie an- oder abzustiegen. CTCs konnten aber auch hier nicht in allen Krebspatienten nachgewiesen werden (Inhestern et al. 2015). Es sollte also prinzipiell möglich sein, auch die von uns vorgeschlagenen Marker im Blut nachweisen zu können. Der Nachweis von HPV-DNA im peripheren Blut bei invasiv wachsenden Zervixkarzinom ist bereits in Ansätzen gelungen (Jeannot et al. 2016).

Die Proben aus dem peripheren Blut der beiden Patienten an verschiedenen Kontrollpunkten im postoperativen Verlauf blieben negativ. Dies trifft auch auf Patient Nummer 28 zu, bei dem ein Rezidiv in Form pulmonaler Fernmetastasen auftrat.

Auf Grund der kleinen Patientenzahl ist es unmöglich, die Ergebnisse dieser Arbeit in den Gesamtkontext des heutigen Stands der Forschung von CTCs bei HNSCC einzuordnen. Zumal es sich bei der Untersuchung dieser Proben nicht um das primäre Ziel der Doktorarbeit handelte. Perspektivisch scheint aber das Modell durchaus auch auf Material von peripherem Blut übertragbar zu sein.

Schlussendlich sollte auch diskutiert werden, welche Konsequenz eine positive postoperative Probe hätte. Würde man einem Patienten eine nebenwirkungsreiche Chemotherapie oder Radiatio zumuten, auch wenn man noch kein makroskopisches Rezidiv sieht? Welche Konsequenz hätte ein positiver Abstrich? Dies sind Fragen, welche nachdem die Machbarkeit des Verfahrens gezeigt ist dringend diskutiert werden müssen.

6. Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich viral-zelluläre Fusionstranskripte als molekulare Marker eignen. Sie sind hochspezifisch und konnten mittel TS-PCR in präoperativen Abstrichen nachgewiesen werden. Ein „proof-of-principle“ konnte damit erbracht werden: einzelne Tumorzellen sind anhand dieser Marker auch außerhalb des Tumorverbandes nachweisbar. Theoretisch sollte also auch ein Nachweis bei Lokalrezidiv in postoperativen Abstrichen möglich sein.

Insgesamt waren nur 9 der 38 Patienten positiv auf HPV 16, davon zeigten nur zwei viral-zelluläre Fusionstranskripte. Damit ist die untersuchte Patientenzahl sehr klein. Es wäre nötig, noch weitere Patienten zu untersuchen und molekulare Marker zu etablieren. Der Schwerpunkt sollte dabei vor allem auf der postoperativen Versorgung liegen.

Von vorneherein ist dieser Ansatz in der Nachsorge nur für einen Teil der Patienten mit Tonsillenkarcinomen möglich. In Anbetracht der schlechten Prognose bei Rezidiv sowie der heute schon mitunter hohen Detektionsraten von HPV, Tendenz eher steigend, handelt es sich trotzdem um einen interessanten Ansatz, um dieser Gruppe von Patienten so die Möglichkeit einer besseren Versorgung zu ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie T-X, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Weinstein JN, Treviño L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Wheeler DA, Kinzler KW, Myers JN. 2011. Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science*, 333 (6046):1154-1157.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. 2010. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 363 (1):24-35.
- Aziz L, Nyman J, Edström S. 2010. T but not N stage predicts survival for patients with tonsillar carcinoma treated with external radiotherapy and brachytherapy. *Acta Oncologica*, 49 (6):821-825.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 48 (11):3282-3287.
- Bonagura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, de Voti JA, Lam F, Steinberg BM, Abramson AL. 2010. Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. *APMIS*, 118 (6-7):455-470.
- Brouha XDR, Tromp DM, Hordijk G-J, Winnubst JAM, de Leeuw JRJ. 2005. Oral and pharyngeal cancer: Analysis of patient delay at different tumor stages. *Head & Neck*, 27 (11):939-945.
- Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruse S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. 2011. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, 29 (32):4294-4301.
- Chung E-J, Oh J-I, Choi K-Y, Lee D-J, Park I-S, Kim J-H, Rho Y-S. 2011. Pattern of cervical lymph node metastasis in tonsil cancer: Predictive factor analysis of contralateral and retropharyngeal lymph node metastasis. *Oral Oncology*, 47 (8):758-762.

- Cosmidis A, Rame JP, Dassonville O, Temam S, Massip F, Poissonnet G, Poupart M, Marandas P, De Raucourt D. 2004. T1-T2 NO oropharyngeal cancers treated with surgery alone. A GETTEC study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 261 (5):276-281.
- Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. 2009. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods*, 158 (1-2):180-183.
- Crosbie EJ, Kitchener HC. 2006. Human papillomavirus in cervical screening and vaccination. *Clin Sci (Lond)*, 110 (5):543-552.
- Das P, Thomas A, Mahantshetty U, Shrivastava SK, Deodhar K, Mulherkar R. 2012. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women. *PLoS One*, 7 (7):e41012.
- Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, Dunning MJ, Gale D, Forsheew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. 2013. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 368 (13):1199-1209.
- de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M. 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*, 13 (6):607-615.
- de Villiers EM. 2013. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, 445 (1-2):2-10.
- de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. 1985. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer*, 36 (5):575-578.
- De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. 2009. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*, 124 (7):1626-1636.
- Durst M, Bosch FX, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. 1991. Inverse relationship between human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression and cell differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV-positive human cell lines. *J Virol*, 65 (2):796-804.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243 (4893):934-937.

- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. 2008. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 100 (4):261-269.
- Fawcett DW. 1956. Electron microscope observations on intracellular virus-like particles associated with the cells of the Lucke renal adenocarcinoma. *J Biophys Biochem Cytol*, 2 (6):725-741.
- Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. 2012. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 13/04/2013.
- Gao G, Johnson SH, Kasperbauer JL, Eckloff BW, Tombers NM, Vasmataz G, Smith DI. 2014. Mate pair sequencing of oropharyngeal squamous cell carcinomas reveals that HPV integration occurs much less frequently than in cervical cancer. *J Clin Virol*, 59 (3):195-200.
- Gebert A. 1995. Identification of M-cells in the rabbit tonsil by vimentin immunohistochemistry and in vivo protein transport. *Histochem Cell Biol*, 104 (3):211-220.
- Gibson MK, Li Y, Murphy B, Hussain MHA, DeConti RC, Ensley J, Forastiere AA. 2005. Randomized Phase III Evaluation of Cisplatin Plus Fluorouracil Versus Cisplatin Plus Paclitaxel in Advanced Head and Neck Cancer (E1395): An Intergroup Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 23 (15):3562-3567.
- Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. 2008. Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16 - Positive and Human Papillomavirus Type 16 - Negative Head and Neck Cancers 10.1093/jnci/djn025. *Journal of the National Cancer Institute*, 100 (6):407-420.
- Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. 2012. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*, 307 (7):693-703.

- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92 (9):709-720.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 75 (3):1565-1570.
- Glombitza F, Guntinas-Lichius O, Petersen I. 2010. HPV status in head and neck tumors. *Pathology - Research and Practice*, 206 (4):229-234.
- Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T. 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol*, 70 (4):2339-2349.
- Grce M, Husnjak K, Skerlev M, Lipozencic J, Pavelic K. 2000. Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Res*, 20 (3B):2097-2102.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54 (18):4855-4878.
- Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, Curado MP, Koifman S, Matos E, Menezes A, Szeszenia-Dabrowska N, Fernandez L, Mates D, Daudt AW, Lissowska J, Dikshit R, Brennan P. 2007. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*, 166 (10):1159-1173.
- Habbous S, Harland LTG, La Delfa A, Fadhel E, Xu W, Liu F-F, Goldstein D, Waldron J, Huang S-H, O'Sullivan B, Liu G. 2014. Comorbidity and prognosis in head and neck cancers: Differences by subsite, stage, and human papillomavirus status. *Head & Neck*, 36 (6):802-810.
- Hafner N, Driesch C, Gajda M, Jansen L, Kirchmayr R, Runnebaum IB, Durst M. 2008. Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*, 27 (11):1610-1617.
- Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E. 2006. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer*, 119 (11):2620-2623.

- Hashibe M, Brennan P, Chuang S-c, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, WÃ¼nsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang Z-F, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P. 2009 Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium
10.1158/1055-9965.EPI-08-0347 *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 18 (2):541-550
- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S. 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 95 (23):1772-1783.
- Hirayama K, Miyasho T, Ohmachi T, Watanabe T, Yokota H, Taniyama H. 2010. Biochemical and immunohistochemical characterization of the amyloid in canine amyloid-producing odontogenic tumor. *Vet Pathol*, 47 (5):915-922.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 338 (7):423-428.
- Huebbers CU, Preuss SF, Kolligs J, Vent J, Stenner M, Wieland U, Silling S, Drebber U, Speel EJ, Klussmann JP. 2013. Integration of HPV6 and downregulation of AKR1C3 expression mark malignant transformation in a patient with juvenile-onset laryngeal papillomatosis. *PLoS One*, 8 (2):e57207.
- Inhestern J, Oertel K, Stemmann V, Schmalenberg H, Dietz A, Rotter N, Veit J, Görner M, Sudhoff H, Junghanß C, Wittekindt C, Pachmann K, Guntinas-Lichius O. 2015. Prognostic Role of Circulating Tumor Cells during Induction Chemotherapy Followed by Curative Surgery Combined with Postoperative Radiotherapy in Patients with Locally Advanced Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Cancer. *PLoS ONE*, 10 (7):e0132901.

- Jeannot E, Becette V, Campitelli M, Calmejane M-A, Lappartient E, Ruff E, Saada S, Holmes A, Bellet D, Sastre-Garau X. 2016. Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 2 (4):201-209.
- Kamstra JI, Jager-Wittenaar H, Dijkstra PU, Huisman PM, van Oort RP, van der Laan BFAM, Roodenburg JLN. 2011. Oral symptoms and functional outcome related to oral and oropharyngeal cancer. *Supportive Care in Cancer*, 19 (9):1327-1333.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 51 (23 Pt 1):6304-6311.
- Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (9):3988-3992.
- Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, Peet CR, Lorenz LD, Nickel KP, Klingelhutz AJ, Lambert PF, Harari PM. 2013. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res*, 73 (15):4791-4800.
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, Doeberitz MvK. 1999 Detection of High-Risk Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer by Amplification of Transcripts Derived from Integrated Papillomavirus Oncogenes *Cancer Research* 59 (24):6132-6136
- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380 (6569):79-82.
- Koivunen P, Rantala N, Hyrynkangas K, Jokinen K, Alho O-P. 2001. The impact of patient and professional diagnostic delays on survival in pharyngeal cancer. *Cancer*, 92 (11):2885-2891.
- Krawczyk E, Suprynowicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R. 2008. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol*, 173 (3):682-688.
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (2):467-475.

- Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp W, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Hildesheim A, Villa LL, Salmeron JJ, Lazcano-Ponce E, Giuliano AR. 2013. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet*, 382 (9895):877-887.
- Lace MJ, Anson JR, Klussmann JP, Wang DH, Smith EM, Haugen TH, Turek LP. 2011. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) genomes integrated in head and neck cancers and in HPV-16-immortalized human keratinocyte clones express chimeric virus-cell mRNAs similar to those found in cervical cancers. *J Virol*, 85 (4):1645-1654.
- Lamarre ED, Seth R, Lorenz RR, Esclamado R, Adelstein DJ, Rodriguez CP, Saxton J, Scharpf J. 2012. Intended single-modality management of T1 and T2 tonsillar carcinomas: retrospective comparison of radical tonsillectomy vs radiation from a single institution. *American Journal of Otolaryngology*, 33 (1):98-103.
- Loning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. 1985. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol*, 84 (5):417-420.
- Lucke B. 1938. Carcinoma in the Leopard Frog: Its Probable Causation by a Virus. *J Exp Med*, 68 (4):457-468.
- Luft F, Klaes R, Nees M, Durst M, Heilmann V, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. 2001. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer*, 92 (1):9-17.
- McAllister RM. 1965. Viruses and Cancer. *Calif Med*, 102:344-352.
- Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Hinerman RW, Malyapa RS, Werning JW, Lansford CD, Villaret DB. 2006. Definitive radiotherapy for tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*, 29 (3):290-297.
- Mockelmann N, Laban S, Pantel K, Knecht R. 2014. Circulating tumor cells in head and neck cancer: clinical impact in diagnosis and follow-up. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 271 (1):15-21.
- Mooren JJ, Kremer B, Claessen SM, Voogd AC, Bot FJ, Peter Klussmann J, Huebbers CU, Hopman AH, Ramaekers FC, Speel EJ. 2013. Chromosome stability in tonsillar squamous cell carcinoma is associated with HPV16 integration and indicates a favorable prognosis. *Int J Cancer*, 132 (8):1781-1789.

- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348 (6):518-527.
- Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparen P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T. 2009. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*, 125 (2):362-366.
- Negri E, Boffetta P, Berthiller J, Castellsague X, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, Lazarus P, Lence JJ, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Shangina O, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Lissowska J, Zhang ZF, Ferro G, Brennan P, La Vecchia C, Hashibe M. 2009. Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Int J Cancer*, 124 (2):394-401.
- Nishimura A, Ono T, Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzell MA, Howley PM, Sakai H. 2000. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol*, 74 (8):3752-3760.
- Olthof NC, Speel EJ, Kolligs J, Haesevoets A, Henfling M, Ramaekers FC, Preuss SF, Drebber U, Wieland U, Silling S, Lam WL, Vucic EA, Kremer B, Klussmann JP, Huebbers CU. 2014. Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. *PLoS One*, 9 (2):e88718.
- Pagano M, Durst M, Joswig S, Draetta G, Jansen-Durr P. 1992. Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. *Oncogene*, 7 (9):1681-1686.
- Park G, Lee SW, Kim SY, Nam SY, Choi SH, Kim SB, Roh JL, Yoon DH, Kim SS, Park JH, Kim YS, Yoon SM, Song SY, Kim JH, Choi EK, S DOA. 2013. Can concurrent chemoradiotherapy replace surgery and postoperative radiation for locally advanced stage III/IV tonsillar squamous cell carcinoma? *Anticancer Res*, 33 (3):1237-1243.

- Perez CA, Patel MM, Chao KSC, Simpson JR, Sessions D, Spector GJ, Haughey B, Lockett MA. 1998. Carcinoma of the tonsillar fossa: prognostic factors and long-term therapy outcome. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 42 (5):1077-1084.
- Perry M, Whyte A. 1998. Immunology of the tonsils. *Immunol Today*, 19 (9):414-421.
- Pfützner C, Schroder I, Scheungraber C, Dogan A, Runnebaum IB, Durst M, Hafner N. 2014. Digital-Direct-RT-PCR: a sensitive and specific method for quantification of CTC in patients with cervical carcinoma. *Sci Rep*, 4:3970.
- Ragin CCR, Reshmi SC, Gollin SM. 2004. Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *International Journal of Cancer*, Volume 110 (5):701-709.
- Rahmati R, Dogan S, Pyke O, Palmer F, Awad M, Lee N, Kraus DH, Shah JP, Patel SG, Ganly I. 2015. Squamous cell carcinoma of the tonsil managed by conventional surgery and postoperative radiation. *Head & neck*, 37 (6):800-807.
- Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A, Som PM, Day TA. 2008. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 134 (5):536-538.
- Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy DR, Schiller JT. 2007. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med*, 13 (7):857-861.
- Rotnáglová E, Tachezy R, Saláková M, Procházka B, Košl'abová E, Veselá E, Ludvíková V, Hamšíková E, Klozar J. 2011. HPV involvement in tonsillar cancer: Prognostic significance and clinically relevant markers. *International Journal of Cancer*, 129 (1):101-110.
- Rous P. 1911. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med*, 13 (4):397-411.
- Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Durst M. 2012. Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One*, 7 (6):e39632.
- Setton J, Caria N, Romanyshyn J, Koutcher L, Wolden SL, Zelefsky MJ, Rowan N, Sherman EJ, Fury MG, Pfister DG, Wong RJ, Shah JP, Kraus DH, Shi W, Zhang Z, Schupak KD, Gelblum DY, Rao SD, Lee NY. 2012. Intensity-Modulated Radiotherapy in the Treatment of Oropharyngeal Cancer: An Update of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Experience. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 82 (1):291-298.

- Shin MK, Sage J, Lambert PF. 2012. Inactivating all three rb family pocket proteins is insufficient to initiate cervical cancer. *Cancer Res*, 72 (20):5418-5427.
- Simard EP, Torre LA, Jemal A. 2014. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol*.
- Singh L, Gao Q, Kumar A, Gotoh T, Wazer DE, Band H, Feig LA, Band V. 2003. The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins. *J Virol*, 77 (2):1614-1620.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. 2004. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*, 108 (5):766-772.
- Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol*, 67 (8):4521-4532.
- Syrjänen S. 2004. HPV infections and tonsillar carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 57 (5):449-455.
- Vernham GA, Crowther JA. 1994. Head and neck carcinoma--stage at presentation. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 19 (2):120-124.
- Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F, Durst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M. 2008. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*, 68 (1):307-313.
- Vojtechova Z, Sabol I, Salakova M, Turek L, Grega M, Smahelova J, Vencalek O, Lukesova E, Klozar J, Tachezy R. 2016. Analysis of the integration of human papillomaviruses in head and neck tumours in relation to patients' prognosis. *International Journal of Cancer*, 138 (2):386-395.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189 (1):12-19.
- Ward MJ, Mellows T, Harris S, Webb A, Patel NN, Cox HJ, Piper K, Ottensmeier CH, Thomas GJ, King EV. 2014. Staging and treatment of oropharyngeal cancer in the HPV ERA. *Head Neck*.
- Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch F. 2002. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*, 21 (10):1510-1517.

- Wong LY, Wei WI, Lam LK, Yuen AP. 2003. Salvage of recurrent head and neck squamous cell carcinoma after primary curative surgery. *Head Neck*, 25 (11):953-959.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7 (1):11-22.
- Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Dürst M, Schwarz E. 2013. Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS ONE*, 8 (6):e66693.
- Zheng ZM, Baker CC. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 11:2286-2302.
- Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Einenkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M. 2003. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene*, 22 (25):3977-3984.

Anhang

Tabelle 12: TNM-Klassifikation der Oropharynxkarzinome (nach Wittekind et al. 2010)

T (Primärtumor)	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Hinweis für Primärtumor
Tis	Karzinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder kleiner in größter Ausdehnung
T2	Tumor größer 2 cm aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor größer 4 cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge, Lamina medialis des Processus pterygoideus, harter Gaumen, Mandibula
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie: M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
N (regionäre Lymphknoten)	
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2	Metastasen wie nachfolgend beschrieben:
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3 cm aber weniger als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastase(n) in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder knotralateralen Lymphknoten, nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
M (Fernmetastasen)	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 13: Stadieneinteilung der Oropharynxkarzinome (nach Wittekind et al. 2010)

Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stadium IVa	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Stadium IVb	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IVc	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 14: Messergebnis zur RNA-Menge und –Qualität am Nanodrop

Patienten- Nummer	Menge in ng/µl	A260	A280	A260/380
1	1359,6	33,99	15,981	2,13
2	737,58	18,44	8,573	2,15
3	1222,27	30,557	14,389	2,12
4	40,38	1,01	0,495	2,04
5	kein Tumormaterial			
6	19,54	0,489	0,212	2,3
7	634,78	15,869	7,617	2,08
8	217,37	5,434	2,614	2,08
9	45,67	1,142	0,554	2,06
10	657,86	16,446	7,916	2,08
11	874,94	21,874	10,385	2,11

12	912,12	22,803	11,009	2,07
13	565,30	14,133	6,836	2,07
14	775,55	19,389	9,240	2,1
15	1338,84	33,471	16,157	2,07
16	722,63	18,066	8,639	2,09
17	2962,09	74,052	35,130	2,11
18	1288,19	32,205	15,409	2,09
19	1145,84	28,646	13,947	2,05
20	927,78	23,194	11,245	2,06
21	1402,18	35,054	16,916	2,07
22	850,39	21,26	10,294	2,07
23	59,19	1,48	0,726	2,04
24	314,55	7,864	3,73	2,11
25	754,01	18,85	9,008	2,09
26	5,16	0,129	0,048	2,72
27	533,61	13,34	6,476	2,06
28	610,19	15,255	7,428	2,05
29	572,54	14,314	6,807	2,1
30	531,28	13,282	6,316	2,1
31	111,65	2,791	1,399	1,99
32	736,09	18,402	8,913	2,06
33	471	11,775	5,579	2,11
34	81,59	2,04	0,957	2,13
35	1053,05	26,326	12,36	2,13
36	380,73	9,518	4,547	2,09
37	385,93	9,648	5,657	1,71
38	90,97	2,274	1,105	2,06
39	722,54	18,064	8,63	2,09
40	1370,76	34,269	16,201	2,12
41	952,83	23,821	11,36	2,1
42	54,37	1,359	0,664	2,05

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: HPV 16-Genom; nicht eingezeichnet: p 670-Promoter; (Crosbie und Kitchener 2006).....	11
Abb. 2: Infektionsverlauf bei persistierender Infektion mit HPV bis hin zum invasiven Karzinom (Woodman et al. 2007)	14
Abb. 3: Anatomische Lage der Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenringes (nach Syrjänen 2004).....	16
Abb. 4: Mikroskopisches Bild der Tonsilla palatina in Übersicht (A) und 5x Vergrößerung (B); HE-Färbung; (Quelle: http://anatomie.net/histowebatlas/n-117.htm , modifiziert).....	17
Abb. 5: Struktur der Transkripte bei episomal abgeleiteten Transkript (B) und der häufigsten Form des viral-zellulären Fusionstranskriptes (A)	43
Abb. 6: cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	43
Abb. 7: Primer-Lokalisation für die APOT-PCR (F1+2: Forward-Primer, R1+2: Reverse-Primer).....	44
Abb. 8: Beispiel einer Sequenz eines episomal abgeleiteten Transkriptes (A) und eines viralzellulären Fusionsstranskriptes (B) (rot-HPV Genom, grün-zelluläres Genom).....	51
Abb. 9: Ergebnis der semi-nested-PCR mit einer SiHa-Verdünnungsreihe in Gelelektrophorese (oben) und nach Southern Blot/Oligohybridisierung (unten)	54
Abb. 10: Beispiel einer β -Aktin-PCR an cDNA der Tumorproben	56
Abb. 11: Exemplarisches APOT-Ergebnis im Rahmen dieser Arbeit.....	57
Abb. 12: Gelbanden aller 9 HPV-positiven Tumorproben.....	58
Abb. 13: Beispielsequenz eines rein viralen Transkriptes.....	59
Abb. 14: Sequenz des viral-zellulären Fusionstranskriptes bei Probe Nummer 28	60
Abb. 15: Sequenz des viral-zellulären Fusionstranskriptes bei Probe Nummer 28	61
Abb. 16: Ergebnis der TS-PCR an cDNA des Tumors von Patient Nummer 28.....	63
Abb. 17: Graphische Auswertung der TS-PCR an cDNA des Tumors von Patient Nummer 28	63
Abb. 18: Ergebnis der TS-PCR an cDNA des Tumors von Patient Nummer 33	64
Abb. 19: Graphische Auswertung der TS-PCR an cDNA des Tumors von Patient Nummer 33	65
Abb. 20: Ergebnis der TS-PCR an präoperativen Abstrichen Patient Nummer 28 in der Gelelektrophorese.....	66

Abb. 21: Ergebnis der TS-PCR an präoperativen Abstrichen Patient Nummer 28 nach Southern Blot und Oligohybridisierung	66
Abb. 22: β -Aktin-PCR der präoperativen Abstriche	67
Abb. 23: Ergebnis der TS-PCR an präoperativen Abstrichen Patient Nummer 33 in der Gelelektrophorese	68
Abb. 24: Ergebnis der TS-PCR an präoperativen Abstrichen Patient Nummer 33 nach Southern Blot und Oligohybridisierung	68
Abb. 25: β -Aktin-PCR der präoperativen Abstriche	69
Abb. 26: Ergebnis der TS-PCR an postoperativen Abstrichen und Blutprobe Patient Nummer 28 in der Gelelektrophorese und nach Southern Blot und Oligohybridisierung ..	70
Abb. 27: Ergebnis der TS-PCR an postoperativen Abstrichen und Blutprobe Patient Nummer 33 in der Gelelektrophorese und nach Southern Blot und Oligohybridisierung ..	71
Abb. 28: Exemplarische Darstellung einer HPV 16-PCR im Gelelektrophoresebild.	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.....	28
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien	31
Tabelle 3: Stufen der Verdünnung von SiHa-RNA.....	39
Tabelle 4: Verwendete Primer für die semi-nested-PCR mit SiHa-Verdünnungsreihe	40
Tabelle 5: Primer und Annealing-Temperatur der APOT-PCR	45
Tabelle 6: Auflistung der kultivierten Zelllinien mit Passage zum Zeitpunkt der Ernte und gewonnener Menge an RNA	53
Tabelle 7: Tumorgröße und Lymphknotenbefall der 38 Patienten mit gesichertem Plattenepithelkarzinom	55
Tabelle 8: Primer für die TS-PCR	62
Tabelle 9: T- bzw. N-Stadium der HPV-positiven Tumoren	72
Tabelle 10: T- bzw. N-Stadium der HPV-negativen Tumore (exklusive der Lymphome, inklusive Patient Nummer 5).....	73
Tabelle 11: Ergebnisse der APOT-PCR im Vergleich mit der HPV 16-PCR an präoperativen Abstrichen.....	73
Tabelle 12: TNM-Klassifikation der Oropharynxkarzinome (nach Wittekind et al. 2010) 99	
Tabelle 13: Stadieneinteilung der Oropharynxkarzinome (nach Wittekind et al. 2010)... 100	
Tabelle 14: Messergebnis zur RNA-Menge und –Qualität am Nanodrop	100

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dürst für die Vergabe der Doktorarbeit und die intensive Betreuung während des Jahres im Labor sowie darüber hinaus. Ich hatte in ihm stets einen Ansprechpartner für Fragen sowie zum Diskussionspunkte. Dabei stieß ich auf großes Interesse.

Dem gesamten Team des Fachbereiches Gynäkologische Molekularbiologie der Frauenklinik an der Universitätsklinik Jena möchte ich danken für die herzliche Aufnahme sowie Unterstützung bei der Arbeit. Dabei möchte ich besonders Frau Katrin Beer und Frau Dr. Martina Schmitz für die Anleitung bei der Arbeit im Labor danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den teilnehmenden HNO-Kliniken, welche mir regelmäßig Tumormaterial zur Verfügung stellten und jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hinsichtlich der Proben hatten.

Meinen Eltern danke ich für ihre kontinuierliche Unterstützung sowie Ermutigungen, diese Doktorarbeit durchzuführen. Ohne sie hätte ich diese Aufgabe nicht meistern können.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst, Frau Dr. rer. nat. Martina Schmitz und Frau Katrin Beer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Name